

10/815 264

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-189852

(P2003-189852A)

(43) 公開日 平成15年7月8日 (2003.7.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00		C 1 2 M 1/00	Z N A A 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00	Z N A	1/34	B 4 B 0 2 9
1/34		C 1 2 Q 1/42	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/42		G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/50		33/58	A

審査請求 未請求 請求項の数 9 OL (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-395308(P2001-395308)

(22) 出願日 平成13年12月26日 (2001. 12. 26)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目43番 2 号

(72) 発明者 南波 昭宏

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目43番 2 号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(72) 発明者 新村 寿信

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目43番 2 号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外 4 名)

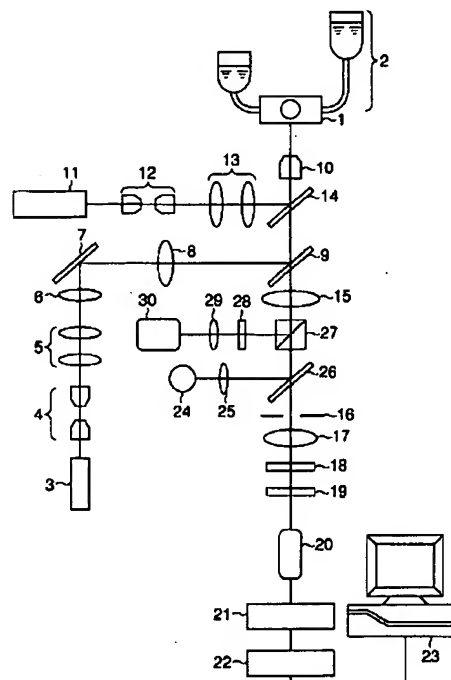
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 塩基配列決定装置および塩基配列決定方法

(57) 【要約】

【課題】 共焦点顕微鏡を利用した塩基配列決定装置を提供すること。

【解決手段】 塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を付着させた担体を分析試料として用いる塩基配列決定装置であって、内部に流路を備えた測定セルと；測定セルの流路に、分析試料である核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段と；担体を捕捉するための第一のレーザー光源と第一の光学系と；核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、流路に流すための手段と；酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を、切断順に励起するための第二のレーザー光源と第二の光学系と；蛍光物質からの蛍光を順次集光する第三の光学系と；集光した蛍光を順次検出する光検出器と；光検出器が発生した識別信号から核酸の塩基配列を読み取る解析手段とを具備する装置。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 所定の反応により得られる結果を蛍光物質の有無および/または種類により判定する装置であって、該反応に供する物質を担持している担体を光トラップにより捕捉した状態で、該反応に供する物質に所定の反応を行う装置において、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えた測定セルと、前記測定セルの流路に、前記担体の懸濁液を搬送するための手段と、

前記担体を捕捉するための第一のレーザー光源と、前記第一のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記担体を捕捉する第一の光学系と、前記担体が担持する物質に所定の反応を行なわせるための反応液を、前記測定セルの流路に一定流速を維持して搬送するための手段と、前記反応により得られる結果を判定するために、該結果を反映している蛍光物質を励起するための第二のレーザー光源と、前記第二のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記蛍光物質を励起する第二の光学系と、前記蛍光物質からの蛍光を集光する第三の光学系と、集光した蛍光を検出する光検出器と、前記光検出器が発生した識別信号から、前記反応の結果を解析する解析手段とを具備することを特徴とする判定装置。

【請求項2】 請求項1に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、前記担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記担体が担持する物質に所定の反応を行なわせるための反応液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管、および搬送される液体に脈流を生じさせることなく液体の流れを制御する部材を具備することを特徴とする装置。

【請求項3】 請求項1または2に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、前記担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記担体が担持する物質に所定の反応を行なわせるための反応液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管を具備し、該配管が、測定セルの流路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐していることを特徴とする装置。

【請求項4】 塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を付着させた担体を分析試料として用いる塩基配列決定装置であって、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えた測定セルと、

前記測定セルの流路に、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段と、前記核酸を付着させた担体を捕捉するための第一のレーザー光源と、前記第一のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記核酸を付着させた担体を捕捉する第一の光学系と、前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に一定流速を維持して搬送するための手段と、前記酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を、切断順に励起するための第二のレーザー光源と、前記第二のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記蛍光物質を切断順に励起する第二の光学系と、前記核酸の塩基を識別標識している蛍光物質からの蛍光を、順次集光する第三の光学系と、集光した蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する識別信号を発生する光検出器と、前記光検出器が発生した識別信号から、前記核酸の塩基配列を読み取る解析手段とを具備することを特徴とする塩基配列決定装置。

【請求項5】 請求項4に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管、および搬送される液体に脈流を生じさせることなく液体の流れを制御する部材を具備することを特徴とする装置。

【請求項6】 請求項4または5に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管を具備し、該配管が、測定セルの流路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐していることを特徴とする装置。

【請求項7】 請求項1～6の何れか1項に記載の装置であって、前記測定セルの流路内に照明光を照射するための光源と、前記光源からの光を前記測定セルの流路内に照射し、前記担体に対して照明光を照射する光学系と、前記照明光の下で、前記担体が、前記第一のレーザー光源により捕捉された画像を撮像するための光学系と、前記担体が捕捉された画像を撮像する撮像手段とを更に

具備することを特徴とする装置。

【請求項8】 分析試料として、塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を付着させた担体を用い、測定セルとして、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えたセルを用いた塩基配列決定方法であって、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を前記測定セルの流路に搬送する工程と、前記核酸を付着させた担体を流路内でレーザートラップにより捕捉する工程と、前記流路内に、核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を一定流速を維持して流す工程と、前記酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を順に励起する工程と、前記工程により励起された蛍光物質が放射する蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する塩基配列を読み取る工程とを具備することを特徴とする塩基配列決定方法。

【請求項9】 前記核酸を付着させた担体がレーザートラップにより捕捉された画像を撮像する工程を更に具備することを特徴とする請求項8に記載の塩基配列決定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸の塩基配列を読み取る塩基配列決定装置、および核酸の塩基配列を決定する方法に関する。より具体的に、本発明は、核酸を担持している担体をレーザー光により捕捉した状態で、核酸の塩基を末端から一つずつ切断する反応を行い、核酸の塩基を標識する蛍光物質の有無および/または種類により塩基配列を決定する装置および方法に関する。また、本発明の塩基配列決定装置は、反応に供する任意の物質を担持している担体をレーザー光により捕捉した状態で所定の反応を行い、該反応により得られる結果を蛍光物質の有無および/または種類により判定する装置として利用可能である。

【0002】

【従来の技術】従来よりDNAやRNAの核酸の塩基配列を決定する装置として、ゲル電気泳動装置、キャピラリー電気泳動装置などが知られている。ゲル電気泳動装置では、ゲルの泳動長を長くすれば原理的にいくらでも長い核酸の塩基配列を読み取ることができる。しかし、泳動長を長くすれば装置がそれだけ大掛かりになる、サンプルの準備に手間と時間がかかるなどの難点を有する。また、キャピラリー電気泳動装置は、一度に多量のサンプルを読み取ることができる点、また、サンプルの準備に手間がかからない点で優れているが、1回の測定で読み取ることができるのは600~700塩基程度であり、長い核酸の塩基配列を読み取るとは難しい。

【0003】また、核酸の塩基配列決定は、従来ラジオアイソトープ(RI)、一般に ^{32}P を用いて行われていた。RIによる手法は、非常に高感度であるが、放射性廃棄物などの処理が面倒である上に、環境に対する配慮が必要になる。

【0004】一方、個々のDNAや細胞などの内部構造を観察する方法として顕微分光測光法がある。この方法は、細胞に蛍光色素を加え、顕微鏡のプレパラート上で蛍光を観測して細胞組織の内部の状態や構造を測定するものである。この方法は、塩基配列を読み取ることを対象としていないし、読み取ることもできない。

【0005】また、流体中の生体細胞や微粒子の測定方法として、フローサイトメトリがよく用いられている。フローサイトメトリは、生物細胞やラテックス粒子などの微粒子を流体中で移送させながら、これらの対象物個々にレーザー光などの光を入射させる。次いで、複数の方向に置かれた受光器により、対象とする細胞や微粒子からの散乱光や蛍光を観測し、対象物の形状や内部構造などを測定する。この方法は、高速で流れる流体中で次々に、細胞や微粒子からの散乱光や蛍光を測定するが、微小な単一分子を検出することができず、塩基配列を読み取ることはできない。

【0006】90年代に入り蛍光を用いた単一分子の検出・イメージングに関する研究が急増している。例えば、単一分子の検出法として、P.M.Goodwin et al., AC C. Chem. Res. 1996, 29, 607-613に記載される手法、および蛍光相関分光法(FCS)などが挙げられる。蛍光相関分光法では、共焦点レーザー顕微鏡の視野の中で、蛍光標識したタンパク質や担体粒子を溶液中に浮遊させ、これらの微粒子のブラウン運動に基づく蛍光強度のゆらぎを解析する。これにより、対象とする微粒子などの数や大きさを計測することができる。この技術については、例えば、金城政孝「蛋白質 核酸 酵素」(1999) Vol.44, No.9, 1431-1437に詳しく論じられている。この方法では、微粒子の大きさや量についての情報しか得ることができない。

【0007】また、DNAが付着したラテックス粒子を流路内で光トラップにより捕捉し、付着したDNAを伸長してその振る舞いや力を測定する試みも行われている(Steven B. Smith et al, Science (1996) Vol.271, 795-)。さらに、流路中に微粒子を搬送するシステムにおいて、レーザー光により個々の粒子を捕捉(トラップ)し、光照射のオン・オフによってトラップした微粒子の移動の動きを制御し、搬送される微粒子の移動の間隔を整える装置が提案されている(特開平5-296914)。このように微粒子を光トラップする方法では、レーザー光などにより微粒子を捕捉する手法については開示しているが、微粒子に付着させた蛍光物質を判別したり、蛍光物質の量を測定したりする方法については開示されていない。

【0008】また、新たな手法を用いて、塩基配列を決定する試みが行われている。すなわち、DNAの一方の鎖の末端からモノヌクレオチド（塩基）を1個ずつ切り離し、その順序を保持したまま基板の上に固定し、これを基板上で蛍光性誘導体に変換して、これをレーザー光で励起し、ビデオカメラで撮影して画像化する手法である。この技術については、石川満「蛋白質 核酸 酵素」(1999) Vol.44, No13, 2019-2023に詳しく述べられている。しかし、この手法は、基板上で各塩基を蛍光性誘導体に変換しなければならない。また、溶媒のない基板上で切り離された各塩基を順番に確実に保持しながら基板上に並ばせなくてはならず、基板の取扱いが大変難しい。

【0009】一般に、蛍光物質を用いて個々の所望の分子をラベルし、それを溶液中で検出・同定する場合、反応容器を用いて該容器内を洗浄液やサンプルを流す方法が使用される。しかし、反応容器内の流路を流れる蛍光標識分子の大きさは、流路の大きさ（管の内径もしくは幅）に比べて極端に小さく、これによる微弱な蛍光を個々毎に確実に同定・検出することは、これまで極めて困難であった。

【0010】一方、Kellerらにより、微小流路の中を流れる蛍光標識分子の蛍光を個々毎に検出し、これによりDNAの塩基配列を決定する手法の原理が提案されている（Single-molecule fluorescence analysis in solution Appl. Spectroscopy, Vol. 50, No. 7, 1996, PP12A-32A）。この提案は、各塩基を蛍光色素で標識したDNAをガラス微粒子に付着させたものをサンプルとして用い、このサンプルを微小流路の中を流しながら赤外レーザー光で捕捉し、この流路に分解酵素を流してDNAの塩基を一つずつ切り離し、各塩基に付いた蛍光分子からの蛍光を検出する方法である。しかし、Kellerらは、着想のみにとどまり、実際にこの方法を具現化するために必要な構成については言及していない。

【0011】その後、Dorreらにより、Kellerらの提案を具体的に試みが行われているが、その報告の中にも述べられているように、塩基配列を読み取るという最終目的を達成するに至っていない（Dorre K et al, Bio imaging 5, 139-152, 1997, Techniques for single molecule sequencing）。このようにこれまで、具体的にどのように微粒子を捕捉し、捕捉された微粒子を所定の位置に移動させ、蛍光を励起、測定するかについて報告されていない。また、どのような機構でサンプル溶液、分解酵素液、洗浄液などを搬入、搬出させるかについても、具体的に記載されたことがない。更に、どのように蛍光信号を処理し、塩基配列を読み取るかについても明確に記載されたことがない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、従来の電気泳動による分離操

作を必要とする塩基配列決定法の問題点を改善した、新たな塩基配列決定法を具体的に実現する手段を提供することを目的とする。すなわち本発明は、無制限の長さの核酸を連続的かつ簡便に配列決定できる塩基配列決定装置および塩基配列決定方法を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、以下のように核酸の塩基配列を読み取る手段を提供する。まず、配列決定したい核酸分子の各塩基を蛍光物質で識別標識し、この核酸を担体に付着することにより分析試料を調製する。この分析試料を、測定セルの流路に導入し、レーザーにより担体を捕捉する。次いで、この状態で流路に分解酵素液を流し、核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する。切断されたモノヌクレオチドが、切断された順序を守って流路内を流れるような条件下で、モノヌクレオチドの塩基を標識している蛍光物質が発する蛍光を順次検出し、核酸の塩基配列を読み取る。

【0014】特に、サンプル溶液、酵素液、洗浄液などを迅速に測定セルの流路に搬送することができる手段であって、分解酵素により切断される核酸の塩基を、その切断順序を守って流路内を搬送させることができる手段について、本発明は提言している。

【0015】すなわち、本発明は以下に記載の手段により達成された。

【0016】（1）所定の反応により得られる結果を蛍光物質の有無および/または種類により判定する装置であって、該反応に供する物質を担持している担体を光トラップにより捕捉した状態で、該反応に供する物質に所定の反応を行う装置において、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えた測定セルと、前記測定セルの流路に、前記担体の懸濁液を搬送するための手段と、前記担体を捕捉するための第一のレーザー光源と、前記第一のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記担体を捕捉する第一の光学系と、前記担体が担持する物質に所定の反応を行なわせるための反応液を、前記測定セルの流路に一定流速を維持して搬送するための手段と、前記反応により得られる結果を判定するために、該結果を反映している蛍光物質を励起するための第二のレーザー光源と、前記第二のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記蛍光物質を励起する第二の光学系と、前記蛍光物質からの蛍光を集光する第三の光学系と、集光した蛍光を検出する光検出器と、前記光検出器が発生した識別信号から、前記反応の結果を解析する解析手段とを具備することを特徴とする判定装置。

【0017】（2）（1）に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、前記担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記担体が担持する物質に所定の反応を行

なわせるための反応液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管、および搬送される液体に脈流を生じさせることなく液体の流れを制御する部材を具備することを特徴とする装置。

【0018】(3)(1)または(2)に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、前記担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記担体が担持する物質に所定の反応を行なわせるための反応液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管を具備し、該配管が、測定セルの流路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐していることを特徴とする装置。

【0019】(4)塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を付着させた担体を分析試料として用いる塩基配列決定装置であって、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えた測定セルと、前記測定セルの流路に、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段と、前記核酸を付着させた担体を捕捉するための第一のレーザー光源と、前記第一のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記核酸を付着させた担体を捕捉する第一の光学系と、前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に一定流速を維持して搬送するための手段と、前記酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を、切断順に励起するための第二のレーザー光源と、前記第二のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記蛍光物質を切断順に励起する第二の光学系と、前記核酸の塩基を識別標識している蛍光物質からの蛍光を、順次集光する第三の光学系と、集光した蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する識別信号を発生する光検出器と、前記光検出器が発生した識別信号から、前記核酸の塩基配列を読み取る解析手段とを具備することを特徴とする塩基配列決定装置。

【0020】(5)(4)に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管、および搬送される液体に脈流を生じさせることなく液体の流れを制御する部材を具備することを特徴とする装置。

【0021】(6)(4)または(5)に記載の装置であって、前記測定セルの流路に、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段、および前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順

に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段が、何れも、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管を具備し、該配管が、測定セルの流路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐していることを特徴とする装置。

【0022】(7)(1)～(6)の何れか1に記載の装置であって、前記測定セルの流路内に照明光を照射するための光源と、前記光源からの光を前記測定セルの流路内に照射し、前記担体に対して照明光を照射する光学系と、前記照明光の下で、前記担体が、前記第一のレーザー光源により捕捉された画像を撮像するための光学系と、前記担体が捕捉された画像を撮像する撮像手段とを更に具備することを特徴とする装置。

【0023】(8) 分析試料として、塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を付着させた担体を用い、測定セルとして、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えたセルを用いた塩基配列決定方法であって、分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を前記測定セルの流路に搬送する工程と、前記核酸を付着させた担体を流路内でレーザートラップにより捕捉する工程と、前記流路内に、核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を一定流速を維持して流す工程と、前記酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を順に励起する工程と、前記工程により励起された蛍光物質が放射する蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する塩基配列を読み取る工程とを具備することを特徴とする塩基配列決定方法。

【0024】(9) 前記核酸を付着させた担体がレーザートラップにより捕捉された画像を撮像する工程を更に具備することを特徴とする(8)に記載の塩基配列決定方法。

【0025】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0026】<分析試料>まず、本発明の塩基配列決定装置で塩基配列を読み取るために使用される分析試料について説明する。分析試料は、図1にその一例を示しており、「塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を担体に付着させたもの」である。

【0027】本発明で使用される「担体」は、レーザー光により捕捉されるものであれば特に限定されない。担体としては、ガラス微粒子、ラテックス粒子、金コロイド粒子などの金属微粒子、磁気微粒子、あるいは生体細胞など、水不溶性の任意のものを使用することができる。また、レーザートラップされる担体粒子は、そのサイズが、一般には直径0.01μm～10μm、好ましくは直径0.05μm～2μm、より好ましくは直径0.1μm～1μmのものが使用される。担体の一例として、直径1μmのガラス微粒子を挙げることができる。

直径1 μm のガラス微粒子として、より具体的には、Bangs Laboratories Inc社(米国)製のストレプトアビジンコートされたシリカビーズを使用することができる。

【0028】本発明において「蛍光物質」は、当該蛍光物質で標識されていることが検出可能なものであれば特に限定されない。例えば、ローダミングリーン(以下、RGともいう)、テトラメチルローダミン-5-イソチオシアネート(以下、TMRともいう)、Cy5(サイファイブ(登録商標)、アマシャム・ファルマシアバイオテック社)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、アクリジニエロー(Acridine Yellow)、テキサスレッド(Texas Red)を使用することができる。ただし、2種類以上の蛍光物質を利用して各塩基を識別標識する場合は、それぞれの蛍光物質が、その放射する波長の違いにより区別して検出される必要がある。

【0029】本発明において「塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸」は、具体例として、図1に示される一例、即ち4種類の塩基を4種類の蛍光物質で識別標識したDNAが挙げられるが、これに限定されない。すなわち、本発明において「核酸」とは、DNAおよびRNAの両方を指す。また、ここで「識別標識」とは、必ずしも4種類の塩基すべてを標識することを意図しておらず、蛍光標識されていない塩基の種類があってもよい。また、2種類もしくは3種類の異なる塩基種が、同一の蛍光物質で標識されていてもよい。

【0030】このような識別標識のバリエーションは、後述の具体的試料(図16、17、19の試料)に例示される。例えば、1種類の蛍光物質を用いて核酸の4種類の塩基のうち1種類の塩基(例えばアデニン)のみを識別標識してもよい(図16参照)。あるいは、放射波長の異なる2種類の蛍光物質を用いて、2種類の塩基をそれぞれ識別標識してもよい(図17参照)。あるいは、放射波長の異なる2種類の蛍光物質を用いて、1種類の塩基を一方の蛍光物質で標識し、その他3種類の塩基を他方の蛍光物質で識別標識してもよい(図19参照)。

【0031】「塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸」は、例えば、以下のとおり調製することができる。ここでは、2種類の蛍光物質を用いて核酸の塩基を識別標識した試料の調製例を述べる。

【0032】まず、担体に付着させる物質として、5'末端がビオチン標識され、各塩基が識別標識されたDNA1本鎖(もしくはRNA1本鎖)を調製する。すなわち、下記の反応溶液

{50mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM KCl、15mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、7mM MgSO₄、0.005% Triton X-100、10mM 2-Mercaptoethanol、1反応あたり1pmolのビオチン標識プライマー、各20 μM の蛍光標識した基質(例えば、RG-dTTP(代わりにRG-dUTP

を使用してよい)、RG-dATP、TMR-dCTP、TMR-dGTP)}

中に、DNA1本鎖(鋳型となる鎖)、伸長酵素を加え、37°Cで30分反応させて試料を調製する。この反応では、蛍光標識された4種類のモノヌクレオチドを基質として利用し、DNA1本鎖(鋳型となる鎖)に相補的なDNA鎖(もしくは相補的なRNA鎖)の合成が起こる。ここで合成された相補的なDNA鎖(もしくは相補的なRNA鎖)が、実際の配列解析に使用される。以下、この相補的なDNA鎖(もしくは相補的なRNA鎖)を、試料DNA(もしくは試料RNA)と称し、試料として使用する。このようにして、5'末端がビオチン標識され、且つ各塩基が蛍光物質により識別標識された、所定の配列を有する試料DNA(もしくは試料RNA)が調製される。ただし、調製例で挙げた緩衝液の組成、反応温度等の条件は、この記載に限定されない。

【0033】次いで、調製された試料DNA(もしくは試料RNA)を、担体に付着させる反応を行なう。試料DNA(もしくは試料RNA)を担体に付着させる手段としては、図1に示されるアビジン・ビオチン反応によるものが挙げられる。しかし、このような付着機能を果たすものであればこれに限定されない。アビジン・ビオチン反応による付着は、上述のBangs Laboratories Inc社(米国)製のストレプトアビジンコートされたシリカビーズ(ガラス微粒子の表面にアビジンが固定化されたもの)を利用して、これに前述の試料DNA(もしくは試料RNA)を結合させることにより行われる。より詳細には、上記シリカビーズと上記試料DNA(もしくは試料RNA)とを、100 mM Tris-HCl (pH8.0)、1.0 M LiCl、0.1% (v/v) Tween20の溶液に加え、室温で反応させて作製することができる。ただし緩衝液の組成、反応温度等の条件は、この記載に限定されない。このようにアビジンとビオチンの1対1の反応を利用して分析試料を作成すれば、担体1つに対して1本のDNA鎖(もしくはRNA鎖)を付着させることができる。

【0034】本発明の塩基配列決定装置に用いる、核酸の塩基を識別標識した分析試料は、このように公知の手法により調製することができる。分析試料の調製についてはZeno Foldes-Papp et al, Nucleosides & Nucleosides, 16(5&6), 781-787, 1997, Exonuclease degradation of DNA studied by fluorescence correlation spectroscopyの記載も参照されたい。

【0035】<塩基配列決定装置>

[第1の実施の形態] 以下、本発明の第1の実施の形態に係る塩基配列決定装置について、図2を参照して説明する。本実施の形態の装置には、1種類の蛍光物質を用いて核酸の塩基を識別標識した分析試料を使用する。

【0036】図2に示すように、本実施の形態の塩基配列決定装置は、下記の構成を具備する。内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面

を備えた測定セル1；前記測定セルの流路に、分析試料である核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段2；前記核酸を付着させた担体を捕捉するための第一のレーザー光源3；前記第一のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記核酸を付着させた担体を捕捉する第一の光学系4～10；前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段2；前記酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を、切断順に励起するための第二のレーザー光源11；前記第二のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記蛍光物質を切断順に励起する第二の光学系12～14、および10；前記核酸の塩基を識別標識している蛍光物質からの蛍光を、順次集光する第三の光学系10、15～19；集光した蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する識別信号を発生する光検出器20；前記光検出器が発生した識別信号から、前記核酸の塩基配列を読み取る解析手段21～23；前記測定セルの流路内に照明光を照射するための光源24；前記光源からの光を前記測定セルの流路内に照射し、前記核酸を付着させた担体に対して照明光を照射する光学系25、26、15、10；前記照明光の下で、分析試料である前記核酸を付着させた担体が、前記第一のレーザー光源により捕捉された画像を撮像するための光学系10、15、27～29；前記核酸を付着させた担体が捕捉された画像を撮像する撮像手段30。

【0037】本発明の塩基配列決定装置は、共焦点レーザー顕微鏡を利用したものである。このように蛍光を検出するための光学系を共焦点光学系とすることにより、切断されたモノヌクレオチド分子の塩基を順次解読することができる。

【0038】本発明の塩基配列決定装置は、核酸を担持させた担体をレーザー光により捕捉しながら、該核酸の塩基を末端から切断する反応を行い、該核酸の塩基配列を読み取るために使用することができる。このような使用に限定されず、本発明の塩基配列決定装置は、反応に供する物質を担持させた担体をレーザートラップにより捕捉し、所定の反応を行なわせ、該反応結果を得るために使用することもできる。所定の反応とは、該反応により得られる結果を蛍光物質の有無および/または種類により判定できるような任意の反応をいう。例えば、抗原を担持している担体に、蛍光標識された抗体を反応させることにより抗原抗体反応を行なってもよいし、1本鎖の核酸を担持している担体に、蛍光標識された1本鎖の核酸を反応させることにより、ハイブリダイゼーションの反応を行なってもよい。

【0039】以下、塩基配列決定装置の第一の実施の形態に係る各構成および動作について、先に挙げた構成の順に説明する。

【0040】《測定セル》まず「内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えた測定セル1」について説明する。測定セルの一例を詳細に図3に示す。図3(a)は測定セルを示す斜視図、(b)は(a)の測定セルを示す平面図、(c)はA-A線に沿う断面の一部を示す図である。

【0041】測定セル1は、まず、その内部に流路1cを備え、且つ光ビームを流路内へ透過させるための透明な面(1bの面)を備えている必要がある。この透明な面(1bの面)の側に対物レンズが配置されることになり、1bの側からレーザー光は入射する。

【0042】また測定セル1は、本発明の塩基配列決定装置に配置した際に、対物レンズの焦点が流路内に合わせられるような位置に流路を備えている必要がある。言い換えると、対物レンズの焦点が流路内に合わせられるように、光ビームを透過する表面部分1bの厚みを適宜設定する必要がある。更に、測定セル1において、流路内へと光ビームが導かれる際に光が透過する面は全て、光の屈折が起こらないように平坦である必要がある。

【0043】更に、本発明では、試料となる核酸の末端から順に切断されたモノヌクレオチドを、その順序を守って流路内を搬送することが必須であるため、流路の幅、深さを適切な微小サイズにする必要がある。

【0044】以上の要件をまとめると、測定セル1は、①流路へ入射する光、流路から出射する光が透過する面は全て透明であること、②流路へ入射する光、流路から出射する光が透過する面は均一の厚みを有する凹凸のない平板であること、③該平板は、対物レンズの焦点が流路内に合わせられる適切な厚みを有していること、④流路の幅、深さは微小であることが必要である。なお、本発明において、透明とは、入射する光に対してのことであり、ヒトの眼で見た透明とは必ずしも一致しない。

【0045】図3において測定セル1は、本体部分1aとレーザー光が透過可能な透明な表面部分1bとから構成され、その間に流路1cが形成されている。なお、測定セルがこのような2つの部分から成る構成に限定されないことはいうまでもない。測定セル1のサイズとしては、特に限定されないが、おおよそ、流路の長さ方向1～25mm、流路の幅方向5～15mm、流路の深さ方向(厚み)0.3～1mmとすることができる。例えば、測定セル1のサイズは、流路の長さ方向約10mm、流路の幅方向約5mm、流路の深さ方向(厚み)約1mmとすることができる。

【0046】図3において本体部分1aは、シリコンウエハから成り、この本体部分にエッチングなどにより流路1c(溝)が形成されている。本体部分1aの厚みは、好ましくは、0.2～1mmである。流路の幅は、好ましくは5～100μm、より好ましくは10～50μm、流路の深さは、好ましくは5～100μm、より好ましくは10～50μmであり、例えば、流路の幅約

50 μ m、流路の深さ約50 μ mとすることができる。流路の長さは、好ましくは1~25mmであり、例えば、約10mmとすることができる。なお、図3において、流路の両端部分は、シリコンウエハに貫通穴が設けてあり、この穴には、接続端子1dを介して溶液搬入・搬出用のチューブが接続されることになる。

【0047】図3において表面部分1bは、ガラスより成る透明の平板（ガラスカバー）となっている。表面部分1bは、上述のとおり、流路へ入射する光および流路から出射する光が透過するため、透明であること、および凹凸のない同一の厚みを有する平板であることが必要である。また、上述のとおり、表面部分1bの厚みは、対物レンズの焦点位置に影響を及ぼすため、0.13~0.21mmのものが好ましく、0.169~0.171mmのものがより好ましい。表面部分1bは、本体部分（シリコン部分）1aと陽極接合などの方法で接合される。

【0048】また、測定セル1は、上述の流路を備えたセルに限定されず、ガラスキャピラリーのような微小な中空円筒状の測定セル、あるいは薄いシート状の測定セルを使用することもできる。

【0049】図3において、流路1cは一本の直線状の溝であり、この場合、先に流した溶液と異なる溶液を流す際には、一旦流路を緩衝液等で洗浄する必要がある。流路を適宜分岐させて増やすことにより、このような洗浄操作を効率よく行うこともできる。例えば、流路を分岐させて、Y字型の流路を作製してもよい。

【0050】また、測定セルは、図4（測定セルの平面図）に示すような形状の流路、すなわち直線状であるが、流路の中央部において流路の幅および深さが共に狭小になっている形状の流路を有してもよい。この流路の狭小になっている部分に、担体捕捉用レーザーおよび励起用レーザーを照射する。狭小になっている部分の幅（図中W₂で示す）および深さは、好ましくは5~50 μ mである。狭小になっている流路部分の長さ（図中Lで示す）は、好ましくは1~10mmである。また、流路の狭小でない部分の幅（図中W₁で示す）および深さは、5~200 μ mである。このように、流路の中央部においてのみ流路の幅および深さを狭くすることにより、溶液の搬送が困難な狭小な範囲を、最小限にすることができる。

【0051】《溶液搬入・搬出機構》次に、「前記測定セルの流路に、分析試料である核酸を付着させた担体の懸濁液を搬送するための手段2」について説明する。該手段は、溶液搬入・搬出機構ともいい、その概略を図5に示す。

【0052】本発明においてこのような溶液搬入・搬出機構を設けた理由は、Dorreらの提案する電気浸透流（electro-osmotic flow: EOF）で溶液を搬送することに、以下の問題点を見出したからである。すなわち、電気浸

透流で溶液を搬送する場合、高い電圧をかける必要がある。そのため、電気浸透流により長時間移動したり、流速を高めたりすると、流路内に熱が発生し、特に酵素などのタンパク質の活性が低下したり、気泡が発生したりする恐れがある。従って、流路の周辺を冷やす等の対策が必要になる。特に反応部の流路が狭小であるほど、熱および気泡が発生し易くなる。

【0053】また、本発明のように溶液搬入・搬出機構を設け、重力またはポンプ駆動で溶液を搬送した場合、流路内の液体の流れは「層流」となり、流路の中心付近で最も流れが速く、流路の周辺にいくに従って流れが遅くなる流速分布を示す。しかし、電気浸透流では、流路内の液体は「プラグフロー」と呼ばれる流れになり、搬送される分子（モノヌクレオチド）の流れが、流路の中心部分に集中しないで、流路内の液体の流れの水平方向などにも分散してしまう可能性がある。このように、流路の周辺部分にモノヌクレオチドが分散すると、流路の中を流れてくるモノヌクレオチドの塩基を、共焦点領域で識別することが難しくなる。よって、このような問題点を考慮し、本発明では、以下で説明するような溶液搬入・搬出機構を設けることにした。

【0054】本発明において使用されるサンプル液（担体の懸濁液）は、担体が所定の濃度で懸濁されているものが好ましい。すなわち、サンプル液は、レーザートラップにより一つの担体が捕捉され易い適切な濃度に設定される。担体濃度が高すぎると、捕捉した担体の背後にもう一つの担体を捉えたり、一旦捕捉された担体が、後から流れてきた他の担体によりはじき飛ばされたりする可能性が高くなる。一方、担体濃度が低すぎると捕捉する可能性が低くなる。従って、0.01~0.3重量%の担体を含む懸濁液が一般に使用される。例えば、ガラス微粒子がリン酸緩衝液に0.1重量%の濃度で懸濁されているものを使用することができる。

【0055】図5が示す溶液搬入・搬出機構において、測定セル1は、ホルダー1eに収容されている。測定セル1は、上述のとおりそのサイズが小さいため、ホルダー内に収容して取り扱う方が簡便である。このホルダー1eの両端に取り付けられた接続端子1dのそれぞれに、搬入用タンク2aおよび搬出用タンク2cが、それぞれ搬入用チューブ2bおよび搬出用チューブ2dを介して接続されている。搬入用タンク2aには、流路に搬送するための溶液が満たされている。溶液としては、サンプル液（担体懸濁液）、流路内洗浄液（緩衝液）、分解酵素液を含む緩衝液などが使用される。チューブ2b、2dは、例えばテフロン（登録商標）材質のものを使用することができる。

【0056】搬入用タンク2aから流路へのサンプル液等の搬入、搬出用タンク2cへの搬出に関しては、両タンクの高さ位置を移動させることにより行うことができる。両タンクの高さ位置の制御により、溶液の流

路への流量、流速を制御することができる。あるいは、ガス圧を用いてシリンジなどを直接駆動し、吸引、排出を行うことで、溶液の搬入、搬出を行うこともできる。この場合、ガス圧の制御により、溶液の流路への流量、流速を制御することができる。また、モーター駆動ポンプにより溶液の搬入、搬出を行うこともできる。

【0057】溶液の流路への流量および流速は、以下の点に注意して制御される必要がある。すなわち、本発明において流速が速すぎた場合、レーザートラップにより捕捉されている担体が逃げってしまうため、トラップされた状態から担体が逃げない程度の流速が上限となる。このように流速の上限は、担体をレーザートラップしている力（レーザー光の出力）との関係で設定される。また、流速が遅すぎた場合、切断されたモノヌクレオチドがブラウン運動により任意の方向に移動し、切断された順序にモノヌクレオチドが並ばなくなる可能性があるため、少なくともモノヌクレオチド分子のブラウン運動を制する程度の流速が必要となる。一般に、流速は0.5 mm/s～10 mm/sに設定される。例えば、流速は1 mm/sに設定される。

【0058】本発明において、塩基配列決定装置の構成を具現化するにあたり、溶液搬入・搬出機構に着目した。というのは、本発明の塩基配列決定装置の構成を具現化する際に、以下の問題を新たに見出したからである。すなわち、レーザーにより捕捉された状態（トラップ状態）にある担体が、液体の流速の急激な変化（脈流）により、トラップ状態を解除されてしまうという問題、並びに、分解酵素により切断されたモノヌクレオチドが、液体の流速の急激な変化により、その切断順序を守って流路内を搬送されなくなるという問題を見出した。なお、本発明の目的とする塩基配列の正確な読み取りのためには、核酸の末端から順に切断されたモノヌクレオチドを、その順序を守って測定セルの流路内を搬送することは最重要課題となる。よって、これらの問題を解決するため、測定セルの流路の幅、深さを微小にすることに加えて、流路内における溶液の搬送は、一定の流速を保持している必要があることに本発明者らは着目した。しかし、一般に流路の幅、深さ（内径）が、1 mm以下になると、溶液の搬送は困難になる。よって、本発明者らは、このような微小な流路内にスムーズに溶液を搬送することができ、且つ一定の流速を保つことができる溶液搬入・搬出機構を構築する必要があるという考えに至った。

【0059】このような要件を満たす溶液搬入・搬出機構の一例として、図6および図7に具体的な構成を挙げる。すなわち、本発明において溶液搬入・搬出機構は、好ましくは、下記の二つの特徴を有する。

【0060】第一に、この機構は、微小な流路にスムーズに溶液を搬送するために、測定セルの流路へ各溶液を搬送するための配管を具備し、該配管が、測定セルの流

路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐していることを特徴とする。本明細書において「配管」は、溶液を測定セルの流路へ導くための流路、および測定セルの流路から廃液として排出するための流路を形成する全ての管を意味する。

【0061】ここで測定セルの流路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐している前記配管は、微小な測定セルの流路に溶液を搬送することが困難であることを解決するために設けられたものであり、測定セルの流路への溶液の搬送を補助する意味を有する。廃液方向へ向かう配管は、測定セルの流路入口近くまで搬送された溶液を、一時的に廃液の方向に逃がすために機能する。一旦、廃液の方向に溶液を流し、その後、溶液の流れる流路を切り替えて測定セルの流路に溶液を導くことにより、測定セルの流路入口近くまでは、速やかに溶液を搬送することができる。なお、この廃液方向へ向かう配管は、配管内の空気を逃がすために機能し得る。

【0062】ここで流路入口近くとは、測定セルの流路への溶液の搬送を補助するという意味において、できるだけ測定セルの流路入口に近い方が好ましい。具体的には、測定セルの流路と「配管」とを連結する接続部分（例えば接続端子）から約10 mm以内のところに配管の分岐点位置していることが好ましい。

【0063】第二に、溶液搬入・搬出機構は、流路を流れる溶液が一定の流速を保つために、搬送される液体に脈流を生じさせることなく、配管内を流れる液体の流れを制御する部材を具備することを特徴とする。「液体の流れを制御する部材」は、液体を流したり、その流れを止めたり、あるいは分岐した配管内を流れる液体の流路を切り替えたりして、液体の流れを制御することができる任意の部材である。一般に該部材としてバルブを使用することができる。

【0064】本発明において、流路内で一定流速の溶液の流れを維持するために（すなわち、溶液に脈流を生じさせることなく）、「液体の流れを制御する部材（バルブ）」について下記のとおり検討した。例えば、一般に使用されるソレノイドバルブは、入手しやすく、その動作をコンピュータにより容易に制御できる点で優れている。しかし、このソレノイドバルブを本発明における溶液搬入・搬出機構に使用すると、液体の流れを制御する動作を行った際に急激な体積変化を起こし、これにより、一定流速を保って流路に溶液を搬送することができない。よって、本発明では、分岐している配管において液体の流れる方向を切り替えたり等の、液体の流れを制御する動作を行った際に急激な体積変化を起こさないバルブを使用することが適切であることを見出した。即ち、液体の流れを制御する動作を行った際に、液体の流量を徐々に変化させるバルブ、例えば回転によって溶液の流れを制御するバルブ（具体的には擦り合わせバルブ

が好ましい)を使用することが適切であることを見出した。ただし、本発明において使用するバルブは、液体の流れを制御する動作を行った際に液体に脈流を生じさせることなく、一定流速の溶液の流れを維持することが可能なものであれば特に限定されない。すなわち、一定流速の溶液の流れを維持することにより、試料DNA(もしくは試料RNA)の末端から順に切断されたモノヌクレオチドが、その順序を守って流路内を搬送され得るものであれば、限定されない。

【0065】このような特徴を有する溶液搬入・搬出機構は、その一例を図6および図7に示すように、分岐した配管、バルブ、T型継ぎ手を具備し、これにより各溶液を効率よくスムーズに微小流路に搬入、搬出できるものである。更にこの機構は、溶液の搬送時に急激な体積変化を生じさせない(即ち、液体の脈流を引き起こさない)特定のバルブを使用することにより、一定の流速を維持することができるものである。

【0066】なお、本明細書において説明する溶液搬入・搬出機構は、任意の液体を、微小流路を備えたセルに搬入する際に利用できるものである。

【0067】以下、溶液搬入・搬出機構の具体的な例について図6を参照して詳細に説明する。ただし、本発明における溶液搬入・搬出機構は、一定流速を維持して微小な流路に溶液を搬送することができるものであれば、図6に示す例に限定されないことはいうまでもない。

【0068】図6に示す溶液搬入・搬出機構は、分解酵素導入シリンジ44、サンプル導入シリンジ45、緩衝液タンク(Buffer tank)46、47、バルブ1~9、T型継ぎ手48、49、陰圧ポンプ52、廃液タンク(Waste tank)53、およびこれらを結ぶ配管より構成されている。

【0069】なお、図6において、溶液搬入・搬出機構の配管は、測定セル1の流路と、接続端子50および51を介して接続されている。このように、測定セルは、その流路の幅が非常に狭いため、サンプル液を流した後の洗浄に時間を要することを考慮し、接続端子50および51を介して交換可能な状態に設置しておくことが望ましい。以降の説明において、接続端子を境にして、測定セル内の流路と測定セル外の流路を、それぞれ「測定セルの流路」、「配管の流路」と区別して呼ぶ。配管は、例えばテフロンより構成されている。

【0070】図6に示す溶液搬入・搬出機構の各構成部分について説明する。

【0071】(シリンジおよび緩衝液タンク) 分解酵素導入シリンジ44およびサンプル導入シリンジ45から、それぞれ分解酵素液およびサンプル液が「配管の流路」に注入される。分解酵素導入シリンジ44およびサンプル導入シリンジ45には、分解酵素液およびサンプル液を希釈したり、溶液が流れる流路を洗浄したりするための緩衝液タンク46および47がそれぞれ設置され

ている。

【0072】なお、図6において、分解酵素液は、測定セルの流路内を左から右(バルブ4からバルブ2の方向)に搬送され、サンプル液は、測定セルの流路内を右から左(バルブ2からバルブ4の方向)に搬送される。図6に示す例に限定されず、分解酵素液、サンプル液とともに、測定セルの流路内を同一方向に向かって流れるように、各シリンジと緩衝液タンクを設置してもよい。ただし、分解酵素液が測定セルの流路内を流れる際には、その上流に、担体捕捉用レーザー(図中、Traplaser)が照射されており、それより下流に励起用レーザー(図中、Excitationlaser)が照射されている必要がある。すなわち、まず流路の上流で、担体捕捉用レーザーに捕捉された担体(核酸を担持している)に分解酵素液が作用し、次いでこの作用により切断された標識ヌクレオチドが、流路の下流で励起用レーザーで励起される必要がある。

【0073】(バルブおよびT型継ぎ手) 溶液搬入・搬出機構の配管において、液体の流れる流路を塞いだり開放したり、あるいは分岐した配管において液体の流れる方向を選択したり等、溶液の流れを制御するために、バルブが設置されている。図6においてバルブ1~9は、2方弁もしくは3方弁であり、図中、バルブに表示されているNOはNormal Open(通常開放)、NCはNormal Close(通常遮断)、COMはCommon(共通)を意味する。上述のとおり、好ましくは、バルブは脈流を起こさないものを使用する。

【0074】一方、T型継ぎ手は、一般に分岐した配管を形成するために使用される。図6においてT型継ぎ手48、49は、測定セルの流路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐した配管を形成するために機能する。すなわち、T型継ぎ手48、49を測定セルの流路のごく近くに設置して配管を分岐させて、測定セルの流路入口近くまで搬送された溶液を一時的に廃液タンクに逃がすことにより、測定セルの流路内に搬送したい溶液を、流路の入口近くまで迅速に導くことができる。これにより、溶液の搬送が困難である測定セルの流路への溶液の搬送を補助することができる。例えば、T型継ぎ手48は、接続端子50のできるだけ近くに位置させることが好ましく、例えば接続端子50から約20mm離れた位置に位置させることができる。同様に、T型継ぎ手49は、接続端子51のできるだけ近くに位置させることが好ましく、例えば接続端子51から約20mm離れた位置に位置させることができる。

【0075】ここで、「配管の流路」の内径はすべて、測定セルの流路幅(例えば50μm)よりある程度広い幅を有していることが好ましい。このように、溶液の搬送をスムーズに行なうために、測定セルの流路幅よりも配管の流路幅を広くすることが好ましく、例えば流路幅

を50～800 μ m、好ましくは約250 μ mとすることができる。一方、測定セルの流路の幅、深さは、本発明の塩基配列決定の目的に適うように、上述のとおり、例えば50 μ mと微小にする必要がある。

【0076】更に、図6に示す溶液搬入・搬出機構は、バルブ4およびバルブ2が設置されている箇所それぞれにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに配管は分岐している。バルブ4およびバルブ2の設置箇所においても、配管を分岐させ、溶液を一時的に廃液タンクに逃がすことにより、測定セルの流路内に搬送したい溶液を、該バルブまで迅速に導くことができる。これにより、測定セルの流路への溶液の搬送を補助することができる。

【0077】例えばバルブ4は、接続端子50から約200mm離れた位置に位置させ、バルブ2は、接続端子51から約200mm離れた位置に位置させることができる。なお、後述の図7のように、バルブ48から廃液タンクに溶液を搬送する配管とバルブ4から廃液タンクに溶液を搬送する配管は、1本の配管で兼任させることもできる。同様に、バルブ49から廃液タンクに溶液を搬送する配管とバルブ2から廃液タンクに溶液を搬送する配管も、1本の配管で兼任させることができる。

【0078】{陰圧ポンプ} 陰圧ポンプ52は、吸引により溶液を廃液タンク53に導くために機能する。ただし、陰圧ポンプを使用しないで、重力によって溶液を廃液タンクに導くこともできる。陰圧ポンプを使用した方が、微小な流路内を効率よく溶液を搬送できるが、ポンプの振動の影響を避けたい場合には、ポンプを使用せず重力によって溶液を搬送する。本発明では、測定セルの流路内にて担体がレーザーにより捕捉されたら、その後の操作は全て、振動を避けるためポンプを使用しない方が望ましい。

【0079】次に、溶液搬入・搬出機構により、各溶液（サンプル液、分解酵素液、緩衝液）を測定セルの流路内に搬入する動作について説明する。

【0080】各溶液は、好ましくは、流路に搬入する前に脱気処理しておく。

【0081】まず、測定セルの流路内にサンプル液を搬送し、次いで測定セルの流路内にて、サンプル液中に含有される担体を、担体捕捉用レーザー（Trap laser）により捕捉する。捕捉された担体以外の担体を、測定セルの流路内から押し流し、洗浄しておく。次いで、測定セルの流路内に分解酵素液を搬送し、担体が担持する核酸のモノヌクレオチドを末端から順に切断する。モノヌクレオチドを標識している蛍光物質を、励起用レーザー（Excitation laser）により励起し、蛍光物質の種類（即ち、塩基の種類）を読み取る。測定を終えたサンプル液等は、緩衝液を流すことにより廃液タンク53へ搬出する。

【0082】以下、詳細に説明する。

【0083】A) 緩衝液の搬送

(A-1) バルブ8を開き、バルブ1をNC側（COMとNCが繋がる）にし、バルブ2をNO側（COMとNOが繋がる）にする。緩衝液タンク47を上方へ押し上げ、重力により緩衝液を廃液タンクに導く。

【0084】(A-2) バルブ2をNC側にし、バルブ5をNO側にし、緩衝液タンク47を上方へ押し上げるにより、緩衝液をT型継ぎ手49を経由して廃液タンクに導く。このとき、バルブ5をNC側にし、バルブ7をNC側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ5をNO側にして重力により廃液タンクに導いても何れでもよい。(A-1)、(A-2)の操作により、T型継ぎ手49まで溶液を迅速に導くことができる。

【0085】(A-3) バルブ5を閉じ、バルブ6を開放し、緩衝液タンク47を上方へ押し上げるにより、測定セルの流路内に緩衝液を搬送する。測定セルの流路を流れた緩衝液は、開放されたバルブ6を通して廃液タンクに導かれる。このとき、バルブ6をNC側にし、バルブ7をNO側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ6をNO側にして重力により廃液タンクに導いても何れでもよい。

【0086】(A-4) バルブ9を開き、バルブ3をNC側にし、バルブ4をNC側にする。バルブ6をNO側にし、緩衝液タンク46を上方へ押し上げ、重力により緩衝液を廃液タンクに導く。このとき、バルブ6をNC側にし、バルブ7をNO側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ6をNO側にして重力により廃液タンクに導いても何れでもよい。

【0087】(A-5) バルブ4をNO側にし、緩衝液タンク46を上方へ押し上げ、重力により緩衝液を廃液タンクに導く。上記(A-1)～(A-5)の操作により、すべての配管内が緩衝液で満たされる。

【0088】B) 試料の投入

バルブ1をNO側にし、バルブ2をNC側にし、バルブ5を閉じる。バルブ6を開放し、シリンジ45のピストンを押し込むことにより、サンプル液（例えばガラスビーズ懸濁液、粒子直径1 μ m、濃度0.1重量%）を測定セルの流路に導く。測定セルの流路を通ったサンプル液は、バルブ6をNC側にし、バルブ7をNO側にし、陰圧ポンプで吸引することにより廃液タンクに導く。なお、重力によりサンプル液を廃液タンクに導いてもよい。

【0089】C) 捕捉された担体以外の担体の洗浄（B/F分離）

担体捕捉用レーザーにより担体を捕捉した後、バルブ1をNC側にし、緩衝液タンク47を上方へ押し上げ、緩衝液を測定セルの流路に導き、流路内の捕捉されなかった担体を洗い流す。このとき、バルブ6をNC側にし、バルブ7をNO側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ6をNO側にして重力により廃液タンクに

導いてもよい。ただしポンプの使用は、その振動により、捕捉されている担体が、押し流されてしまう可能性があるため望ましくない。この操作により、レーザー光により捕捉された担体以外の担体は洗い流され、測定セルの流路内は洗浄される。

【0090】D) 分解酵素液の搬送

バルブ9を閉じ、バルブ3をNO側にし、バルブ4をNC側にし、バルブ6を閉じる。バルブ5を開放し、シリンジ44のピストンを押し込むことにより、分解酵素液を測定セルの流路に導く。測定セルの流路を通過した分解酵素液は、バルブ5をNC側にし、バルブ7をNC側にし、陰圧ポンプで吸引することにより廃液タンクに導いてもよいし、重力により廃液タンクに導いてもよい。ただしこの操作においても、ポンプの振動により、捕捉されている担体が押し流されてしまう可能性があるため、ポンプの使用は望ましくない。

【0091】E) 流路の洗浄

分解酵素による核酸の各塩基の切断後、バルブ9を開き、バルブ3をNC側にし、バルブ4をNC側にし、バルブ6を閉じて、緩衝液タンク46を上方へ押し上げ、緩衝液を測定セルの流路に導く。この操作により流路の洗浄を行なう。この洗浄操作は、バルブ5をNC側にし、バルブ7をNC側にして陰圧ポンプで吸引することにより効率よく行なうことができる。

【0092】次いで、溶液搬入・搬出機構の別の例について図7を参照して説明する。この具体例は、基本的には、図6に示す例と同じであり、同一の構成要素には同じ符号を付している。図7に示す溶液搬入・搬出機構は、分解酵素導入シリンジ44、サンプル導入シリンジ45、緩衝液タンク(Buffer tank)46、47、バルブ21~25、T型継ぎ手48、49、54、55、陰圧ポンプ52、廃液タンク(Waste tank)53、およびこれらを結ぶ配管より構成されている。

【0093】図7に示す溶液搬入・搬出機構は、図6に示す例と同じく、分岐した配管、バルブ、T型継ぎ手を具備し、これにより各溶液を効率よくスムーズに微小流路に搬入、搬出できるものである。また同様に、この機構は、溶液の搬送時に急激な体積変化を生じさせない(即ち、液体の脈流を引き起こさない)特定のバルブを使用することにより、一定の流速を維持することができるものである。

【0094】また、図6に示す例と同様、T型継ぎ手48、49は、測定セルの流路入口近くにおいて、測定セルの流路へ向かう方向と廃液へ向かう方向とに分岐した配管を形成するために機能している。この分岐した配管を利用して、溶液を一時的に廃液タンクに逃がすことにより、測定セルの流路内に搬送したい溶液を、測定セルの流路入口近くまで迅速に導くことができる。これにより、溶液の搬送が困難である測定セルの流路への溶液の搬送を補助することができる。例えば、T型継ぎ手48

は接続端子50から約20mm離れた位置に位置させ、T型継ぎ手49は接続端子51から約20mm離れた位置に位置させることができる。

【0095】また、図6に示す例と同様、測定セル外の配管の流路幅を、測定セル内の流路幅(例えば50 μ m)より広くしておくことは、溶液をスムーズに搬送する上で好ましい。

【0096】以下に、図7に示す溶液搬入・搬出機構の動作について説明する。

【0097】A) 緩衝液の搬送

サンプル投入前に、下記の操作により、全ての流路内を緩衝液で満たしておく。

【0098】(A-1) バルブ21を開き、バルブ23をNO側にし、緩衝液タンク47を上方へ押し上げ、重力により緩衝液を廃液タンクに導く。このとき、バルブ23をNC側にし、バルブ25をNC側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ23をNO側にして重力により廃液タンクに導いても何れでもよい。この操作により、T型継ぎ手49まで溶液を迅速に導くことができる。

【0099】(A-2) バルブ23を閉じ、バルブ24をNC側もしくはNO側にし、緩衝液タンク47を上方へ押し上げるにより、測定セルの流路内に緩衝液を搬送する。測定セルの流路を流れた緩衝液は、バルブ24を通過して廃液タンクに導かれる。このとき、バルブ24をNC側にし、バルブ25をNO側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ25をNO側にして重力により廃液タンクに導いても何れでもよい。

【0100】(A-3) バルブ22を開き、バルブ24をNC側もしくはNO側にし、緩衝液タンク46を上方へ押し上げ、重力により緩衝液を廃液タンクの方に導く。このとき、バルブ24をNC側にし、バルブ25をNO側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ24をNO側にして重力により廃液タンクに導いても何れでもよい。上記(A-1)~(A-3)の操作により、すべての流路内が緩衝液で満たされる。

【0101】B) 試料の投入

バルブ21を閉じ、バルブ23を閉じ、バルブ24を開放し、シリンジ45のピストンを押し込むことにより、サンプル液(例えばガラスビーズ懸濁液、粒子直径1 μ m、濃度0.1重量%)を測定セルの流路に導く。測定セルの流路を通ったサンプル液は、バルブ24をNC側にし、バルブ25をNO側にし、陰圧ポンプで吸引することにより廃液タンクに導く。なお、重力によりサンプル液を廃液タンクに導いてもよい。

【0102】C) 捕捉された担体以外の担体の洗浄(B/F分離)

レーザー光により担体を捕捉した後、バルブ21を開き、緩衝液タンク47を上方へ押し上げ、緩衝液を測定セルの流路に導き、流路内の捕捉されなかった担体を洗

い流す。このとき、バルブ24をNC側にし、バルブ25をNO側にして陰圧ポンプにより吸引してもよいし、バルブ24をNO側にして重力により廃液タンクに導いてもよい。ただしポンプの使用は、その振動により、捕捉されている担体が、押し流されてしまう可能性があるため望ましくない。この操作により、レーザー光により捕捉された担体以外の担体は洗い流され、測定セルの流路内は洗浄される。

【0103】D) 分解酵素液の搬送

バルブ22を閉じ、バルブ24を閉じ、バルブ23を開放し、シリンジ44のピストンを押し込むことにより、分解酵素液を測定セルの流路に導く。測定セルの流路を通過した分解酵素液は、バルブ23をNC側にし、バルブ25をNC側にし、陰圧ポンプで吸引することにより廃液タンクに導いてもよいし、重力により廃液タンクに導いてもよい。ただしこの操作においても、ポンプの振動により、捕捉されている担体が押し流されてしまう可能性があるため、ポンプの使用は望ましくない。

【0104】E) 流路の洗浄

分解酵素による核酸の各塩基の切断後、バルブ22を開き、バルブ24を閉じて、緩衝液タンク46を上方へ押し上げ、緩衝液を測定セルの流路に導き、流路の洗浄を行なう。このとき、バルブ23をNC側にし、バルブ25をNC側にして陰圧ポンプで吸引することにより効率よく流路の洗浄を行なうことができる。

【0105】《担体捕捉用レーザー光源》次に、「前記核酸を付着させた担体を捕捉するための第一のレーザー光源3」について説明する。第一のレーザー光源から出射されるレーザー（以下、担体捕捉用レーザーともいう）は、捕捉したい担体のサイズに応じて、その種類および照射波長について適宜選択することができる。あるいは、担体捕捉用レーザーを選択した後に、そのレーザーにより捕捉される担体のサイズを選択してもよい。

【0106】本発明において使用されるレーザーは、レーザートラップで慣用的に使用されるものであれば限定されず、一般に488nm（アルゴンレーザー）～1064nm（Nd:YAGレーザー）のレーザーを使用することができる。例えば、波長855nmのCr:LiSAFレーザーを使用することができる。あるいは、Nd:YAGレーザーなどの赤外の固体レーザーや色素レーザーなどを用いてもよい。好ましくは、波長700nm以上の赤外域のレーザーを使用する。例えば、直径1μmのガラス微粒子をレーザートラップにより捕捉するためには、855nmの出力300mWのCr:LiSAFレーザーを使用することができる。

【0107】なお、レーザーの波長と捕捉される粒子サイズとの関係については、詳しくは、W.H.Wright, G.J. Sonek, and M.W. Berns, Appl.Phys. Lett., Vol.63 (6), 1993, Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezersの記載を参照されたい。

【0108】担体捕捉用レーザーの出力は、高ければそれだけ担体を捕捉する力が強くなり望ましいが、装置（対物レンズ）や分析試料、並びに核酸を構成する塩基を末端から切断する分解酵素に損傷を与えるという弊害がある。よって、出力はこのような弊害をもたらさない程度に高く（好ましくは2W以下に）設定される。一般に担体を捕捉するために100～1000mWのレーザー出力を使用する。

【0109】《第一の光学系》次いで、「前記第一のレーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記核酸を付着させた担体を捕捉する第一の光学系4～10」について説明する。該光学系は、コリメートレンズ4、ビームエキスパンダー5、レンズ6、ミラー7、レンズ8、ダイクロイックハーフミラー9、対物レンズ10から構成される。これら光学系4～10は、担体捕捉用レーザーから出射される光ビームの光路上にこの順に配置されている。

【0110】本発明の装置において、対物レンズによる集光光学系は、共焦点光学系となっており、対物レンズの開口数（NA）で決まる非常に狭い領域に、レーザー光がフォーカスされるようになっている。例えば、本発明の装置に使用される対物レンズの開口数（NA）は、0.9である。

【0111】担体捕捉用レーザーの光ビームは、コリメートレンズ4により平行ビームとされ、ビームエキスパンダー5によりビーム直径を大きくする。その後、レンズ6でミラー7面上に集光させ、レンズ8で平行光にした後、ダイクロイックハーフミラー9により光路を曲げて対物レンズ10に導かれる。対物レンズ10を介した光ビームを測定セル1の流路内の所定の位置に集光させる。

【0112】担体の流路内での捕捉位置は、ミラー7の角度を変えることにより、流路の長さ方向について調整することができる。また、対物レンズ10の光軸方向の移動により、光軸方向についてその捕捉位置を制御することができる。このように調整・制御をして、流路内の所定の位置に担体捕捉用レーザーを照射することが可能になる。ここで所定の位置は、塩基配列解析時には励起用レーザーとの位置関係で決められるものであるが、このことについては後述する。

【0113】なお、担体捕捉用レーザーを照射して担体を捕捉する際には、流路内をサンプル液が流動していてもよいし、流動していなくてもよい。

【0114】上述のようにして流路内に集光させた光ビームが、流路内を流れに沿って移動する担体を1個捕捉し得る。その様子を図8に示す。図8に示すとおり、担体捕捉用レーザーの光ビームは、対物レンズ10により集光された後、測定セル1の表面部分1bを貫通して、流路1c内の溶液の中央部分にフォーカスされ、担体の懸濁液を照射する。これにより、担体1個を流路内で捕

捉する。

【0115】《酵素液搬送手段》次に、「前記核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を、前記測定セルの流路に搬送するための手段」について説明する。本実施の形態では、酵素液を流すための手段は、担体の懸濁液を搬送するための手段2と共用することができる。よって、溶液搬入・搬出機構に関する上記説明も参照されたい。

【0116】ここで「末端から順に切断する」とは、試料となる核酸が5'末端の側で担体に付着している場合は、核酸を構成するモノヌクレオチドを3'末端から順に切断することを意味する。逆に、試料となる核酸が3'末端の側で担体に付着している場合、核酸を構成するモノヌクレオチドを5'末端から順に切断することを意味する。

【0117】「酵素液」は、3'側からのみモノヌクレオチドを一つずつ切断するエキソヌクレアーゼ、あるいは5'側からのみモノヌクレオチドを一つずつ切断するエキソヌクレアーゼなど、適宜選択することができる。例えば、エキソヌクレアーゼI、T7ポリメラーゼを使用することができる。酵素液の有する酵素活性は、所望の分解反応を行う範囲内で適宜設定されるが、好ましくは、10~200nMの活性を有する酵素液を使用する。

【0118】図5に示す溶液搬入・搬出機構において、酵素液は、搬入用タンク2aから流路へ所定の流速で流され、流路から搬出用タンク2cへと排出される。上述のとおり、酵素液を流路に所定の流速で流すためには、両タンクの上下の高さ位置を制御したり、シリンジのガス圧を制御したりすることにより行うことができる。また、モーター駆動ポンプにより溶液の搬入、搬出を行うこともできる。

【0119】先に説明したとおり、酵素液の搬送において、所定の流速を定常的に保つことは、末端から順に切断されたモノヌクレオチドを、その順序を守って流路内を搬送することが本発明で要求されているため、重要な意味を有する。本発明において流速が遅すぎた場合、レーザートラップにより捕捉されている粒子が逃げってしまうため、トラップされた状態から粒子が逃げない程度の流速が上限となる。また、流速が遅すぎた場合、切断されたモノヌクレオチドがブラウン運動により任意の方向に移動し、切断された順序にモノヌクレオチドが並ばなくなる可能性があるため、少なくともモノヌクレオチド分子のブラウン運動を制する程度の流速が必要となる。核酸の塩基配列の解析精度を高めるためには、捕捉されている粒子が逃げない範囲において流速は速い方が好ましい。すなわち、流速は、粒子をレーザートラップしている力（レーザー出力）との関係で設定される。一般に、流速は一般に0.5mm/s~10mm/sに設定される。例えば、流速は1mm/sに設定される。

【0120】《励起用レーザー光源》次に、「前記酵素

液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を、切断順に励起するための励起用レーザー光源11」について説明する。励起用レーザーは、一般に可視域の波長を有しており、使用した蛍光物質を励起させる波長を有しているものを使用する。例えば、蛍光物質としてローダミンググリーンを使用した場合には固体ブルーレーザー（473nm）を、TMRを使用した場合にはアルゴンレーザー（514.5nm）を使用する。

【0121】なお、本実施の形態では励起用レーザー光源は1つであり、そのため当該レーザー光源により励起される1種類の蛍光物質のみを核酸塩基の標識のために使用することとなる。

【0122】《第二の光学系》続いて、「励起用レーザー光源からの光ビームを前記測定セルの流路内に集光し、前記蛍光物質を切断順に励起する第二の光学系12~14、および10」について説明する。該光学系は、コリメートレンズ12、ビームエキスパンダー13、ダイクロイックハーフミラー14、対物レンズ10から構成される。これら光学系12~14、および10は、レーザー光源11から出射される光ビームの光路上にこの順に配置されている。

【0123】励起用レーザー光源11からの光ビームは、コリメートレンズ12により平行ビームとされ、ビームエキスパンダー13によりビーム直径を大きくした後、ダイクロイックハーフミラー14により光路を曲げて対物レンズ10に導かれる。対物レンズ10を介した光ビームを、測定セル1の流路内の所定の位置に集光させる。

【0124】励起用レーザーの流路内での照射位置は、ダイクロイックハーフミラー14の角度を変えることにより、流路の長さ方向について調整することができる。また、対物レンズ10の光軸方向の移動により、光軸方向についてその照射位置を制御することができる。このように調整・制御をして、流路内の所定の位置に励起用レーザーを照射することが可能になる。

【0125】よって本実施の形態では、上述の担体捕捉用レーザーの光ビームおよび励起用レーザーの光ビームの両方を、一つの対物レンズ10で集光し、測定セル1の流路内にフォーカスさせる。

【0126】本発明において塩基配列解析時には、担体捕捉用レーザーの光ビームと励起用レーザーの光ビームは、測定セルの流路内に所定の位置関係で照射されている必要がある。具体的には、塩基配列解析時に両ビームは、図9に示すような状態で流路内に照射されている必要がある。すなわち、溶液が流れている流路の上流で、担体捕捉用レーザーにより担体が捕捉され、その下流で励起用レーザーが照射されている必要がある。このような所定の位置関係により、担体に担持された核酸を構成するモノヌクレオチドを、切断された順に励起用レーザー

一の照射領域内に順次流入させ、次いでモノヌクレオチドの塩基を標識している蛍光物質を順次励起することが可能になる(図9参照)。

【0127】従って、塩基配列解析時に上記所定の位置関係で両レーザービームが照射されるように、予め光ビームの光路を設定しておくか、あるいは、解析前に担体捕捉用レーザービームまたは励起用レーザービームの少なくとも一のビームを適切な位置に移動させることが必要である。図2に示される本実施の形態では、このような光ビームの光路の制御は、光ビームを照射するための光学系(具体的にはダイクロイックハーフミラー9または

ダイクロイックハーフミラー14)により行われる。【0128】塩基配列解析時の両レーザービームの所定の位置は、対物レンズ視野において両レーザーが離れた位置に位置していれば特に限定されないが、好ましくは両レーザーが対物レンズ視野内で最も離れた位置に(約25 μ m離れて)位置することである。

【0129】このように、本実施の形態では一つの対物レンズにて2つのレーザービームを所定の離れた位置に集光させることが可能である。しかし、本発明の塩基配列決定装置は、一つの対物レンズにて2つの光ビームを離れた位置に集光させる態様に限定されず、2つの対物レンズにて装置を組み立ててもよい(後述する第4の実施の形態および図13を参照)。

【0130】《第三の光学系》次に、「前記核酸の塩基を識別標識している蛍光物質からの蛍光を順次集光する第三の光学系10、15~19」について説明する。該光学系は、対物レンズ10、レンズ15、アパーチャー16、集光レンズ17、I α カットフィルター18、バンドパスフィルター19から構成される。これら光学系15~19は、蛍光物質から放射される蛍光の光路上にこの順に配置されている。なお図2において、対物レンズ10と、集光された蛍光を検出する受光器20とを結合光学系を「測定用光学系」と称する。

【0131】蛍光物質からの蛍光は、対物レンズ10を通過し、レンズ15によりアパーチャー16に結像させ、その後集光レンズ17により受光器20の受光面にフォーカスさせる。受光器20の受光面の前方に、I α カットフィルター18、バンドパスフィルター19を配置し、蛍光物質からの蛍光のみが受光器20に届くようにする。I α カットフィルター18は、測定セル1の壁面、およびミラー裏面などの光路途中の光学系による反射光などのノイズ光をカットする。バンドパスフィルター19は、蛍光波長の光のみを効率的に通過させる。

【0132】《光検出器》次いで、「集光した蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する識別信号を発生する光検出器20」について説明する。光検出器20には、アバランシェフォトダイオード、あるいは光電子増倍管等の微弱光検出器を用いることができる。光検出器20は、切断されたモノヌクレオチドの順に、当該モノ

ヌクレオチドの塩基の種類に対応する蛍光を検出する。そして検出された蛍光を、それに対応する識別信号に変換して、後述の解析手段へと伝達する。具体的には、光検出器20で光電子に変換される。

【0133】《解析手段》最後に、「前記光検出器が発生した識別信号から、前記核酸の塩基配列を読み取る解析手段21~23」について説明する。解析手段は、光検出器20より得られた信号を信号処理部21により処理し、その結果をコンピュータ23のモニター画面上に表示する。具体的には、光検出器20で光電子に変換された光信号は、信号処理部21で波形整形などの処理を行った後、光子パルスとしてコンピュータ23に導かれ、パルス数が計数され、コンピュータの画面上に表示される。信号制御部22は、コンピュータに送られる最終情報を担体捕捉用レーザー光源にフィードバックして、担体のトラップを解除することができる。

【0134】《担体の捕捉状態を観察するための構成》図2に示す本実施の形態の塩基配列決定装置には、担体を捕捉した状態を撮影するために前記測定セルの流路内に照明光を照射するための光源24、照明用光学系25、26、15、10が設置されている。図2において、光源24はハロゲンランプであり、照明用光学系25、26、15、10は、レンズ25、可動ミラー26、レンズ15、対物レンズ10から構成される。光源24からの照明光は、レンズ25を通過して可動ミラー26により測定セル方向へ屈曲し、レンズ15を通過した後、対物レンズ10にて分析試料に集光される。

【0135】なお、本発明の装置においてこの光源および照明用光学系は必ずしも必要ではない。従って、使用しない時には、可動ミラー26を移動することにより、必要に応じて測定用光学系から取り外してもよい。

【0136】また、図2に示す本実施の形態の塩基配列決定装置には、前記照明光の下で、担体を捕捉した状態を撮影するための撮影用光学系10、15、27~29、および撮像手段30が設置されている。図2において撮影用光学系10、15、27~29は、対物レンズ10、レンズ15、可動プリズム27、バンドパスフィルター28、レンズ29から構成され、撮像手段30は、CCDカメラである。照明光を照射された分析試料からの反射光は、対物レンズ10、レンズ15を通過した後、可動プリズム27によりCCDカメラ30方向へ屈曲され、バンドパスフィルター28で必要な波長の光だけを選択的に透過させ、レンズ29を介して撮像手段(CCDカメラ)30へ送られる。このように、撮影用光学系は、CCDカメラ30で効率的に受光される波長の光を選択的に透過させ、テレビモニター上に画像化させる。

【0137】なお、図2において撮影用光学系および照明用光学系は、測定セルの流路内の捕捉された担体を照射し撮像するため、可動プリズム27により、測定用光

光学系と一致させることが必要である。また、本発明の装置においてこの撮影用光学系および撮像手段は必ずしも必要ではない。従って、担体を捕捉する時のみ使用し、その他の時には、可動プリズム27を移動することにより、必要に応じて測定用光学系から取り外してもよい。

【0138】[第2の実施の形態]次に、本発明の第2の実施の形態に係る塩基配列決定装置について、図10を参照して説明する。

【0139】第2の実施の形態の基本的な構成は、第1の実施の形態と同じである。図10の第2の実施の形態において、図2に示す第1の実施の形態と同一な部分(符号1〜30)に関しては同符号を付している。本実施の形態の装置には、2種類の蛍光物質を用いて核酸の塩基を識別標識した分析試料を使用する。

【0140】そのため、本実施の形態では、励起用レーザー光源として、放射波長の異なる2種類のレーザー、例えばアルゴンイオンレーザー(波長514.5nm)、固体ブルーレーザー(波長473nm)を用いる。従って、図10における本実施の形態の装置には、励起用レーザー光源11に加えて第二の励起用レーザー光源31が設置されている。

【0141】第二の励起用レーザー光源31からの光ビームも、励起用レーザー光源11からの光ビームと同様に、コリメートレンズ32により平行ビームとされ、ビームエキスパンダー33によりビーム直径を大きくされる。その後、ミラー34、2つのダイクロイックハーフミラー35および14により光路を曲げて対物レンズ10に導かれる。これら2つの励起用レーザー光源11および31からの光ビームは、ダイクロイックハーフミラー35により一つの光路にまとめられ、対物レンズ10に導かれる。

【0142】このように、波長の異なる2種類のレーザーを用いることで、2種類の蛍光物質を励起することができる。2種類の蛍光物質としては、例えば、ローダミングリーン(RG)とテトラメチルローダミン-5-イソチオシアネート(TMR)を使用することができる。ローダミングリーンは、固体ブルーレーザー(473nm)により励起され、550nmの波長の蛍光を放射し、一方、テトラメチルローダミン-5-イソチオシアネートは、アルゴンレーザー(514.5nm)により励起され、570nmの波長の蛍光を放射する。2種類の蛍光物質を用いて異なる波長の蛍光を放射させることで、2種類の塩基を区別して検出することが可能になる。

【0143】本実施の形態では、放射された異なる波長の蛍光を検出するために、測定用光学系も2系統とする必要がある。すなわち、2種類の蛍光物質からの蛍光を、ダイクロイックハーフミラー36により、それぞれの蛍光物質の発光波長に合わせて透過光強度が最大になるように調整して光路を2分割する。2分割された光

は、その一方は、バンドパスフィルター19を通して、受光器20にて受光される。受光器で光電子に変換された光信号は、信号処理部21にて処理され、光子パルスとしてコンピュータ23に送られ、パルスの数が計数される。もう一方の光も同様に、バンドパスフィルター37を通して、受光器38にて受光される。受光器20からの信号は信号処理部39にて処理され、コンピュータ23に送られる。なお、信号制御部22は、受け取った情報を担体捕捉用レーザー光源にフィードバックして、担体のトラップを解除することができる。

【0144】このような2系統の測定用光学系の構成は、第1の実施の形態における1系統の測定用光学系と基本的には同じである。2つの受光器で測光する領域は同一の領域である。このようにして2つの光路について、それぞれ独立に蛍光を検出することができる。

【0145】第2の実施の形態の装置は、以下の利点を有する。すなわち、1回の測定で同時に2種類の蛍光の位置を読み取ることができ、これに対応する塩基配列を読み取ることができる。従って、第1の実施の形態の装置と比べて、測定の回数を減らすとともに、測定精度を向上させることができる。

【0146】なお、本発明の塩基配列決定装置は、3つの励起用レーザー光源を設置し、区別して検出され得る3種類の蛍光物質を用いて塩基を識別標識した核酸の塩基配列を決定することもできる。更に3つを超える励起用レーザー光源を設置した塩基配列決定装置も可能であり、このような装置も本発明の範囲に含まれる。

【0147】[第3の実施の形態]次に、本発明の第3の実施の形態に係る塩基配列決定装置について、図11を参照して説明する。

【0148】第3の実施の形態の基本的な構成は、第1の実施の形態と同じである。図11に示す第3の実施の形態において、図2に示す第1の実施の形態と同一な部分(符号1〜30)に関しては同符号を付している。本実施の形態の装置には、第1の実施の形態と同様、1種類の蛍光物質を用いて核酸の塩基を識別標識した分析試料を使用する。

【0149】本実施の形態では、流路を備えた測定セルとして、図12に示すような全面透明な測定セル1'を使用する。図12は、図3(c)に対応する図であり、流路に沿って切断された断面図である。

【0150】測定セル1'の構造は、図3に示す測定セル1と基本的に同じである。測定セル1が、レーザー光の透過する面のみが透明であるのに対し、ここで使用する測定セル1'は、全面が透明なセルである点で異なる。測定セル1'は、例えば、ガラス板、パイレックス(登録商標)、あるいはアクリル、塩化ビニル樹脂のような透明なプラスチック板から構成され得る。

【0151】このような測定セル1'を使用することにより、担体粒子が捕捉された状態を観察するための撮影

31

用光学系を、測定用光学系から分離させることができる。すなわち、図11において、撮影用光学系43、28～29は、測定用光学系である対物レンズ10から受光器20までの光学系と分離されている。

【0152】本実施の形態では、ハロゲンランプ24による照明光と、担体捕捉用レーザー3による光ビームを、対物レンズ43に通して拡大した後、バンドパスフィルター28で必要な波長の光だけを選択的に透過させ、レンズ29を介して撮像手段（CCDカメラ）30で撮像する。

【0153】また、本発明の塩基配列決定装置は、図11に図示されるとおり、各光学系の動作に対応して開閉されるシャッターを備えていてもよい。具体的には、図11において、担体捕捉用レーザーを光源3から測定セルへと導く第一の光学系、励起用レーザーを光源11から測定セルへと導く第二の光学系、および対物レンズ10から受光器20までの測定用光学系のそれぞれに、順にシャッター40、41、42が設置されている。

【0154】このように、撮影用光学系を測定用光学系から分離させることにより、観察のための光学系の測定光への妨害を除去することができるとともに、透過光を観察することになるので、視野が明るくなり、担体粒子の搬送の様子や粒子捕捉の様子を明確に検知することができる。

【0155】〔第4の実施の形態〕次に、本発明の第4の実施の形態に係る塩基配列決定装置について、図13を参照して説明する。

【0156】第4の実施の形態の基本的な構成は、第1の実施の形態と同じである。図13に示す第4の実施の形態において、図2に示す第1の実施の形態と同一部分（符号1～30）に関しては同符号を付している。本実施の形態の装置には、第1の実施の形態と同様、1種類の蛍光物質を用いて核酸の塩基を識別標識した分析試料を使用する。

【0157】本実施の形態では、第3の実施の形態に係る装置と同様、流路を備えた測定セルとして、図12に示すような全面透明な測定セル1'を使用する。

【0158】このような測定セル1'を使用することにより、担体粒子が捕捉された状態を観察するための撮影用光学系を、測定用光学系から分離させることができる。すなわち、図13において、撮影用光学系43、28～29は、測定用光学系である対物レンズ10から受光器20までの光学系と分離されている。

【0159】このように、撮影用光学系を測定用光学系から分離させることにより、観察のための光学系の測定光への妨害を除去することができるとともに、透過光を観察することになるので、視野が明るくなり、担体粒子の搬送の様子や粒子捕捉の様子を明確に検知することができる。

【0160】更に、本実施の形態では、全面透明な測定

32

セル1'を使用することにより、担体捕捉用レーザーを測定セルへと導く第一の光学系を、励起用レーザーを測定セルへと導く第二の光学系および測定用光学系から分離させることが可能になる。すなわち、図13において、第一の光学系4～9、43は、第二の光学系11～14、10および測定用光学系10、14～20から分離されている。図13において、担体捕捉用レーザーは、測定セルの上面から入射して流路内に集光し、励起用レーザーは、測定セルの下面から入射して流路内に集光する。

【0161】このように、担体捕捉用レーザー（赤外光）と励起用レーザー（可視光）を、同一の光学系を共用して流路内に集光させないことにより、それぞれのレーザー光の焦点位置を合わせることが容易になる。一般に、赤外光と可視光とを、同一の光学系を通して同じ位置に焦点位置を合わせるためには補正光学系が必要とされる。しかし図13のように、担体捕捉用レーザーと励起用レーザーとを別々の光学系を通すことにより、それぞれ独自に焦点位置を合わせることが可能になる。

【0162】なお、上記全ての実施の形態に係る塩基配列決定装置の動作について、詳しくは以下の塩基配列決定方法の説明も参照されたい。

【0163】＜塩基配列決定方法＞次に、本発明の塩基配列決定方法について説明する。なお、本発明の塩基配列決定方法は、上述の装置を用いて行うことができる。上述の装置の構成も適宜参照されたい。

【0164】本発明の塩基配列決定方法は、分析試料として、塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を付着させた担体を用い、測定セルとして、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えたセルを用いた塩基配列決定方法であって、

1) 分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を前記測定セルの流路に搬送する工程と、

2) 前記核酸を付着させた担体を流路内でレーザートラップにより捕捉する工程と、

3) 前記流路内に、核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を流す工程と、

4) 前記酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を順に励起する工程と、

5) 前記工程により励起された蛍光物質が放射する蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する塩基配列を読み取る工程と

を具備する方法である。

【0165】好ましい態様において、本発明の塩基配列決定方法は、分析試料として、塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した核酸を付着させた担体を用い、測定セルとして、内部に流路を備え、光ビームを前記流路内へ透過させるための透明な面を備えたセルを用いた塩基配列決定方法であって、

1) 分析試料である前記核酸を付着させた担体の懸濁液を前記測定セルの流路に搬送する工程と、
 2-1) 前記核酸を付着させた担体を流路内でレーザートラップにより捕捉する工程と、
 2-2) 前記工程により捕捉された担体に、蛍光物質で識別標識された核酸分子が付着していることを、励起光を照射することにより確認する工程と、
 2-3) 前記流路内において、前記担体を捕捉するためのレーザーの照射位置を、前記励起光の照射位置の上流に位置させる工程と、
 3) 前記流路内に、核酸を構成するモノヌクレオチドを末端から順に切断する酵素液を流す工程と、
 4) 前記酵素液により切断されたモノヌクレオチドの塩基を識別標識している蛍光物質を順に励起する工程と、
 5) 前記工程により励起された蛍光物質が放射する蛍光を順次検出し、検出された蛍光に対応する塩基配列を読み取る工程と

を具備する方法である。

【0166】本発明の塩基配列決定方法で使用される分析試料および測定セルについては、上述の説明どおりである。以下、1)～5)の各工程について順に説明する。塩基配列決定方法の全体の流れについては、図14に示すフローチャート図も参照されたい。

【0167】1) 分析試料の搬送

分析試料(蛍光物質で塩基を識別標識した核酸を付着させた担体懸濁液)を、図5に示すような溶液搬入・搬出機構により測定セルに搬送する。

【0168】2-1) 担体の捕捉

担体捕捉用レーザーを点灯し、レーザートラップにより担体1個を捕捉する。担体1個が捕捉されたら、流路中に存在する捕捉されなかったその他の担体を緩衝液で洗い流しておくとい。ここで、担体が1個捕捉された状態は、撮像手段(CCDカメラ)により確認することができる。

【0169】2-2) 捕捉した担体に、蛍光物質で識別標識された核酸分子が付着されていることを、下記のとおり確認することもできる。レーザートラップにより担体を捕捉した状態で、励起用レーザーを点灯する。このとき、励起用レーザーの光ビームは、担体捕捉用レーザーと同じ光路を通して捕捉された担体を照射する。これにより、担体が担持している核酸を標識している蛍光物質が励起される。

【0170】次いで、蛍光物質から放射される蛍光の有無を測定する。放射される蛍光の信号は、電気信号(フォトンパルス)に変換されて検出される。蛍光測定の結果の一例を図15に示す。ある閾値を予め決めておき、これよりもフォトンパルス数が多く測定された場合のみ、蛍光が検出されたと判断する。この閾値は、装置のバックグラウンドノイズなどを考慮して適宜設定され得る。

【0171】フォトンパルス数が閾値より低く蛍光が検出されなかった場合(フローチャートで“NO”の場合)、担体に核酸分子が付着していないと判断される。このとき信号制御部にて司令を出し、担体捕捉用レーザーの照射を止め、担体のトラップを解除する。再び担体の懸濁液を測定セルに流し、蛍光測定にて蛍光が検出されるまで同様の動作を繰り返す。

【0172】フォトンパルス数が閾値より高く蛍光が検出された場合(フローチャートで“YES”の場合)、担体に核酸分子が付着していると判断される。

【0173】2-3) 捕捉された担体に核酸分子が付着していることが確認されたら、同一の光路を通して担体を照射している担体捕捉用レーザーと励起用レーザーの照射位置を、塩基配列の解析に必要な所定の状態(図9に示す所定の状態)にする。すなわち、核酸塩基を1つずつ切断する分解酵素液を流路内に搬送する際、その上流で担体が捕捉されていて、その下流で励起用レーザーが照射されている状態をつくる。具体的には、励起用レーザービームと同じ光路上にあった担体捕捉用レーザービームを、光軸と垂直方向(流路の長さ方向)に移動させることにより所定の状態をつくることことができる。あるいは、励起用レーザービームの光路を、担体捕捉用レーザービームの光路からずらすことにより、図9に示す所定の状態を作り出してもよい。

【0174】ここで、担体捕捉用レーザーおよび/または励起用レーザービームを移動させる距離は、対物レンズ視野において両レーザーが離れた位置に位置していれば特に限定されないが、好ましくは両レーザーが対物レンズ視野内で最も離れた位置に位置するまで(約25μm)移動させる。

【0175】3) 分解酵素の導入

塩基配列を解析するための所定の状態に両レーザービームが設定された後、溶液搬入・搬出機構により分解酵素を含む緩衝液を測定セルの流路に流す。分解酵素の導入により、担体に付着している核酸のモノヌクレオチドは、末端から順に切断される。

【0176】分解酵素を含む緩衝液としては、100mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、2.5mM DTTを使用することができる。分解酵素は、10~200nMの活性を有するエキソヌクレアーゼ、T7ポリメラーゼなどを使用することができる。この緩衝液中で室温で分解反応を行う。緩衝液の組成、温度等は、上記したものに限定されない。

【0177】流速は、上述のとおり、切断されたモノヌクレオチドが、その切断順序を守って流路を流れていくことが可能な速度(下限)であって、担体がレーザートラップされた状態から逃げない速度(上限)であれば限定されない。例えば、約1mm/sにすることができ

【0178】なお、流路内に溶液を搬送する操作は、担

体が流路内にて捕捉された後は脈流が生じないように行う必要がある。これは、脈流により、捕捉されている担体が押し流されないようにするためであり、切断された塩基がその順序を守って流路内を搬送されるようにするためである。

【0179】4) 蛍光発光

分解酵素により切断されたモノヌクレオチドの塩基は、上記流速の制御下において、流路内の励起用レーザーの照射位置（即ち、測定領域）に切断された順に流入する。これにより、塩基を識別標識している蛍光物質が順次励起され、このとき放射される蛍光が、順次対物レンズを介して測定用光学系に導かれる。

【0180】5) 塩基配列の読み取り

核酸の各塩基を識別標識している蛍光物質により、塩基配列が順次判読される。

【0181】以下、核酸の塩基の種類と蛍光物質の種類とを対応付けて識別標識した具体例を挙げる。

【0182】例えば図16に、1種類の蛍光物質を用いてDNA塩基の1種類を識別標識した分析試料について、塩基配列の読み取り結果を示す。この分析試料は、

【0183】図中、「○」は該塩基に蛍光物質による標識が有ることを、「×」は該塩基に蛍光物質による標識がないことを示す。試料DNAの4種類の塩基のうち、全アデニンを蛍光標識したものを試料1-1、全グアニンを蛍光標識したものを試料1-2、全チミンを蛍光標識したものを試料1-3とする。

【0184】このように、単一の塩基のみを標識した場合、全塩基配列を読み取るためには最低3回の測定回数を必要とするが、その読み取り結果が示すとおり、DNAの塩基配列を読み取ることができる。

【0185】また図17に、2種類の蛍光物質を用いて2種類の塩基を識別標識した分析試料について、塩基配列の読み取り結果を示す。この分析試料は、本発明の第2の実施の形態の装置を用いて配列を読み取ることができる。

【0186】図中、「○」は該塩基に蛍光物質A（例えばTMR）による標識が有ることを、「●」は該塩基に蛍光物質B（例えばRG）による標識が有ることを、「×」は該塩基に蛍光物質による標識がないことを示す。試料DNAの4種類の塩基のうち、アデニンおよびグアニンを2種類の蛍光物質A、Bでそれぞれ識別標識したものを試料2-1、チミンおよびシトシンを2種類の蛍光物質A、Bでそれぞれ識別標識したものを試料2-2とする。その読み取り結果をまとめて図18に示す。

【0187】このように2種類の蛍光物質を使用すると、1回の測定で同時に2種類の塩基の位置を検出することができ、全塩基配列を読み取るための測定回数を最

低2回とすることができる。1種類の蛍光物質を使用した場合（図16に示す例）と比較して短時間で配列決定を行うことが可能になる。

【0188】また図19に、2種類の蛍光物質を用いて、1種類の塩基とその他3種類の塩基とを識別標識した分析試料について、塩基配列の読み取り結果を示す。この分析試料は、本発明の第2の実施の形態の装置を用いて配列を読み取ることができる。

【0189】図中、「○」は該塩基に蛍光物質A（例えばTMR）による標識が有ることを、「●」は該塩基に蛍光物質B（例えばRG）による標識が有ることを示す。試料DNAの4種類の塩基のうち、アデニンを蛍光物質Aで標識し、その他の塩基（G、T、C）を蛍光物質Bで標識したものを試料3-1、グアニンを蛍光物質Aで標識し、その他の塩基（A、T、C）を蛍光物質Bで標識したものを試料3-2、チミンを蛍光物質Aで標識し、その他の塩基（A、G、C）を蛍光物質Bで標識したものを試料3-3とする。

【0190】このように、2種類の蛍光物質を使用して4種類の塩基全てを識別標識すると、4種類の塩基全てについて蛍光が観測されるようになるので、測定の精度を向上させることができる。すなわち、図16、図17に示す例のように蛍光が観測されなかった塩基の数を、蛍光が検出されなかった時間の長さにより決定する必要がなくなる。

【0191】なお本発明の方法は、1つの分析試料に対して、DNA分子を変えて複数回の配列決定データを取得し、データの信頼性を高めることが望ましい。なお、核酸の塩基を識別標識するパターンは、図16、図17、および図19に示す例に限定されず、適宜設定することができる。

【0192】

【発明の効果】以上説明したように、本発明は、新規な塩基配列決定装置および塩基配列決定方法を提供する。本発明によれば、熟練を必要とせず簡単に、しかも短時間で核酸の塩基配列を読み取ることができる。また、本発明は、試料となる核酸の長さに原理的に制限がないという利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の塩基配列決定に使用する分析試料を示す図。

【図2】 本発明の第1の実施の形態に係る塩基配列決定装置の構成を示す図。

【図3】 測定セルの構成を示す図。

【図4】 測定セルの別の例を示す図。

【図5】 溶液搬入・搬出機構の構成を示す図。

【図6】 溶液搬入・搬出機構の自動動作の例を示す図。

【図7】 溶液搬入・搬出機構の自動動作の例を示す図。

【図8】 測定セルの流路内で担体1個を捕えている様子を示す図。

【図9】 塩基配列解析時における測定セルの流路内の様子を示す図。

【図10】 本発明の第2の実施の形態に係る塩基配列決定装置の構成を示す図。

【図11】 本発明の第3の実施の形態に係る塩基配列決定装置の構成を示す図。

【図12】 全面透明な測定セルの構成を示す図。

【図13】 本発明の第4の実施の形態に係る塩基配列決定装置の構成を示す図。

【図14】 本発明の塩基配列決定方法の流れを示すフローチャート図。

【図15】 分析試料の蛍光の有無を測定した結果の一例を示す図。

【図16】 DNAの塩基配列を解析した結果の一例を示す図。

【図17】 DNAの塩基配列の解析した結果の一例を示す図。

【図18】 図17の測定結果を示す図。

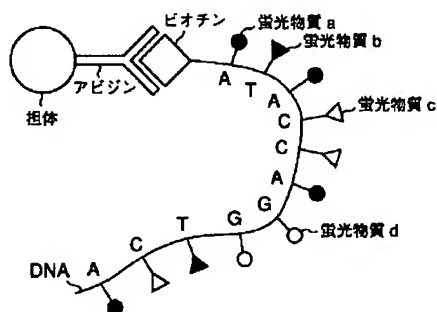
【図19】 DNAの塩基配列を解析した結果の一例を示す図。

【符号の説明】

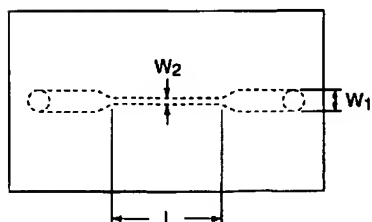
1、1'…測定セル、1a、1a'…本体部分、1b…表面部分、1c、1c'…流路、1d、1d'…接続端子、1e…流路を備えた測定セルのホルダー、2…溶液

搬入・搬出機構、2a…搬入用タンク、2b…搬入用チューブ、2c…搬出用タンク、2d…搬出用チューブ、3…担体捕捉用レーザー光源、4…コリメートレンズ、5…ビームエキスパンダー、6…レンズ、7…ミラー、8…レンズ、9…ダイクロイックハーフミラー、10…対物レンズ、11…励起用レーザー光源、12…コリメートレンズ、13…ビームエキスパンダー、14…ダイクロイックハーフミラー、15…レンズ、16…アパーチャー、17…集光レンズ、18…I rカットフィルタ、19…バンドパスフィルタ、20…受光器、21…信号処理部、22…信号制御部、23…コンピュータ、24…ハロゲンランプ、25…レンズ、26…可動ミラー、27…可動プリズム、28…バンドパスフィルタ、29…レンズ、30…CCDカメラ、31…第二の励起用レーザー光源、32…コリメートレンズ、33…ビームエキスパンダー、34…ミラー、35…ダイクロイックハーフミラー、36…ダイクロイックハーフミラー、37…バンドパスフィルタ、38…受光器、39…信号処理部、40…シャッター(1)、41…シャッター(2)、42…シャッター(3)、43…対物レンズ、44…分解酵素導入シリッジ、45…試料導入シリッジ、46…緩衝液タンク、47…緩衝液タンク、48…T型継ぎ手、49…T型継ぎ手、50…接続端子、51…接続端子、52…陰圧ポンプ、53…廃液タンク、54…T型継ぎ手、55…T型継ぎ手

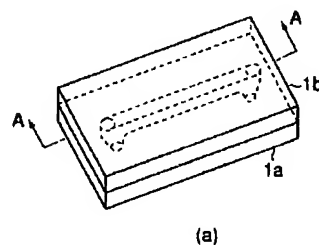
【図1】



【図4】

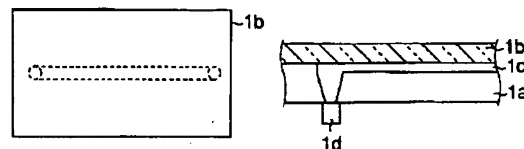


【図3】

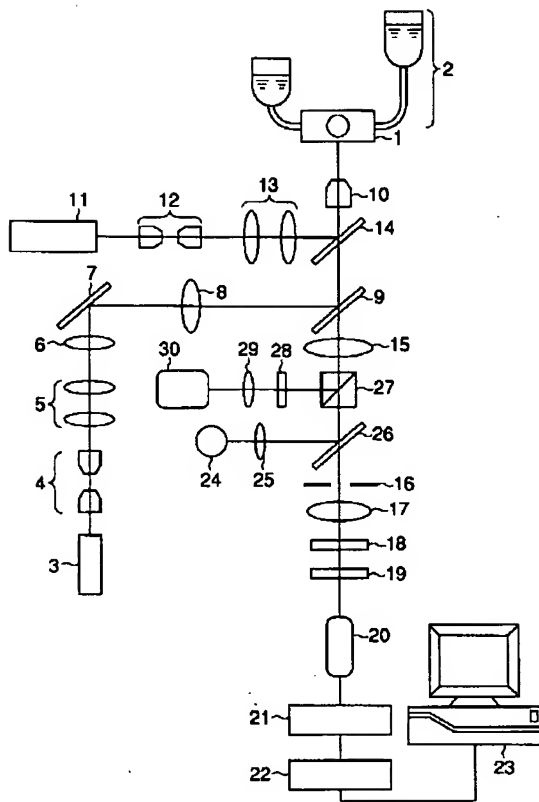


(b)

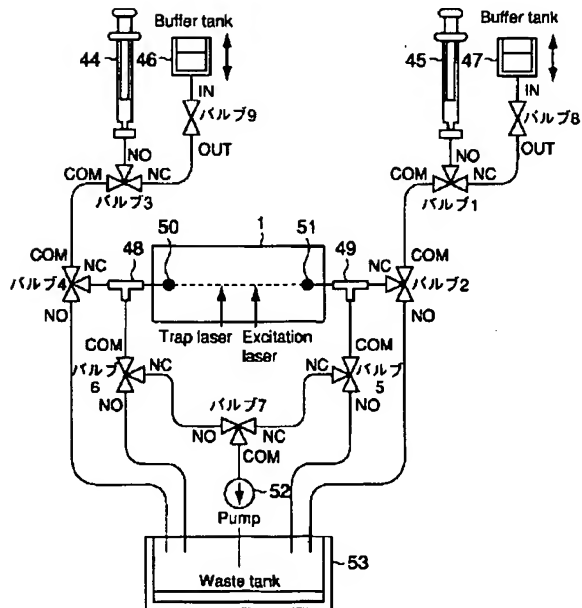
(c)



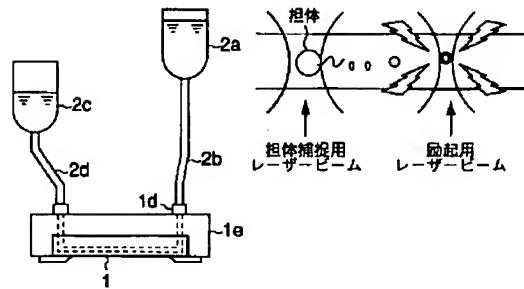
【図2】



【図6】

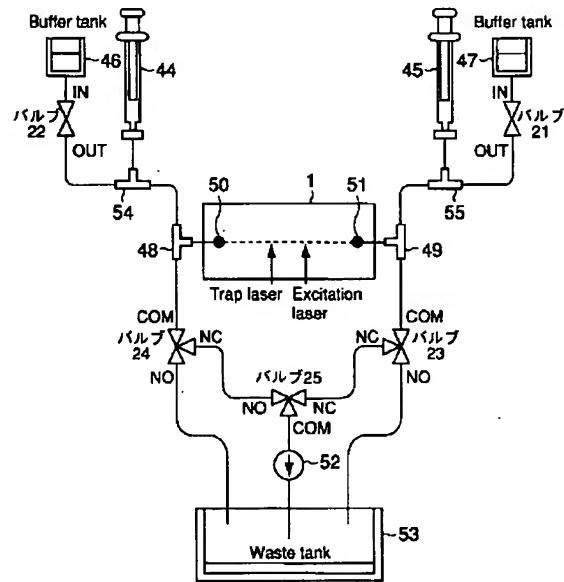


【図5】

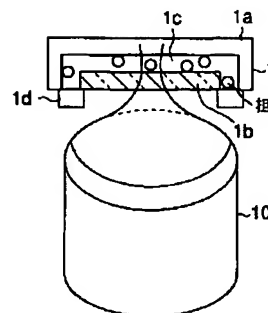


【図9】

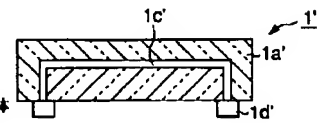
【図7】



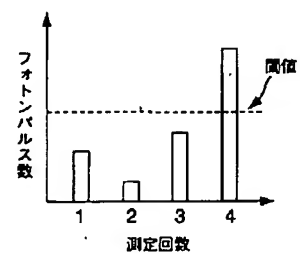
【図8】



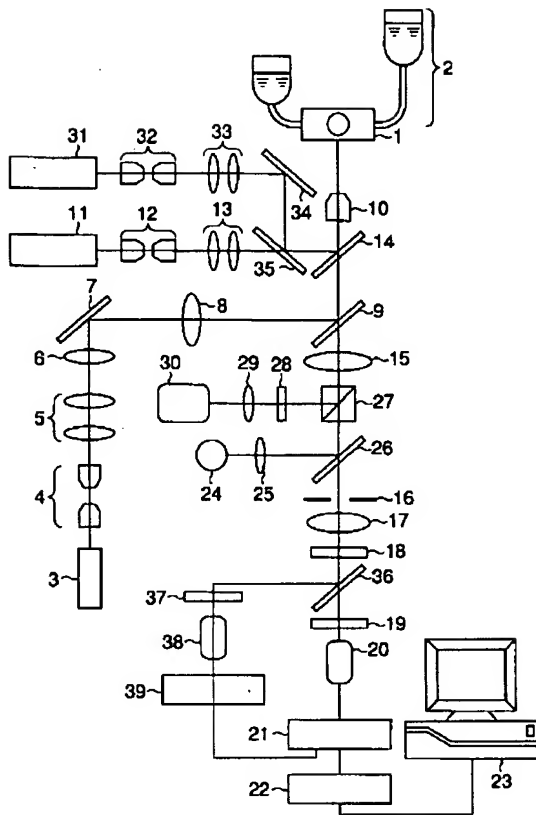
【図12】



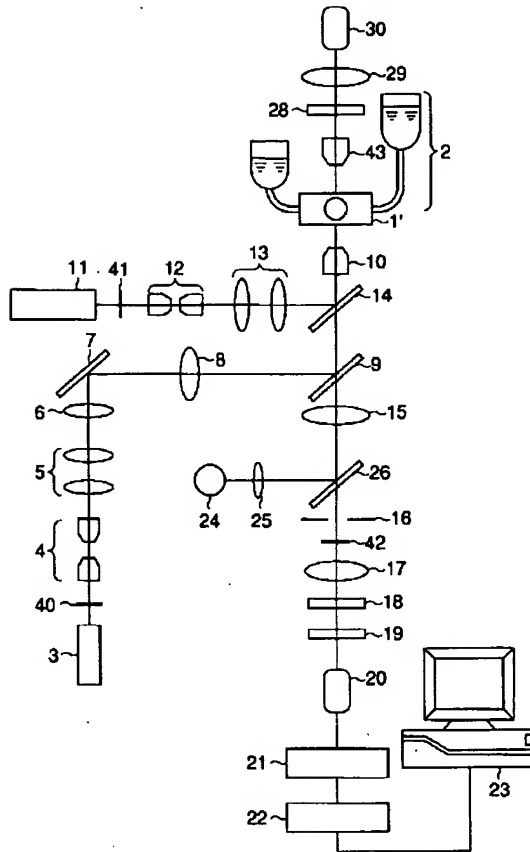
【図15】



【図10】



【図11】



【図16】

試料1-1	試料1-2	試料1-3
A → O	A → X	A → X
G → X	G → O	G → X
T → X	T → X	T → O
C → X	C → X	C → X

[読み取り結果]

A	T	T	A	G	C	C	A	G	A	A	G	T
試料1-1	O	X	X	O	X	X	X	O	X	O	O	X
試料1-2	X	X	X	O	X	X	X	O	X	X	X	O
試料1-3	X	O	O	X	X	X	X	X	X	X	X	O

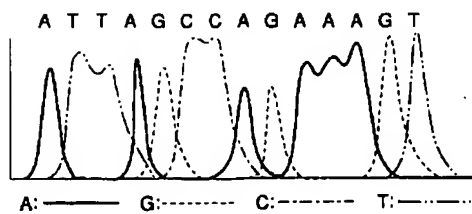
【図17】

試料2-1	試料2-2
A → O	A → X
G → ●	G → X
T → X	T → O
C → X	C → ●

[読み取り結果]

A	T	T	A	G	C	C	A	G	A	A	G	T
試料2-1	O	X	X	O	●	X	X	O	●	O	O	●
試料2-2	X	O	O	X	X	●	●	X	X	X	X	O

【図18】



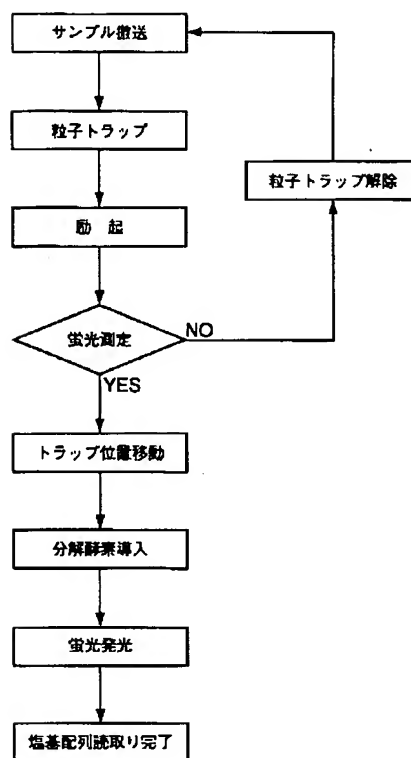
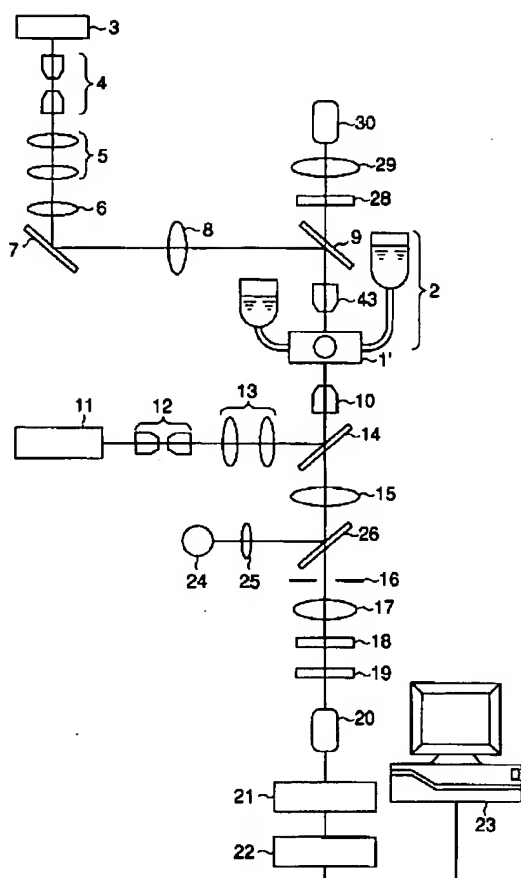
【図19】

試料3-1	試料3-2	試料3-3
A → O	A → ●	A → ●
G → ●	G → O	G → ●
T → ●	T → ●	T → O
C → ●	C → ●	C → ●

[読み取り結果]

A	T	T	A	G	C	C	A	G	A	A	G	T
試料3-1	O	●	●	O	●	●	O	●	O	O	●	●
試料3-2	●	●	●	●	O	●	●	●	●	●	●	●
試料3-3	●	O	●	●	●	●	●	●	●	●	●	O

【図14】



(51)Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/58

F I
C 1 2 N 15/00

テーマコート¹ (参考)

(72)発明者 澤田 龍治
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

(72)発明者 高橋 威夫
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA35 DA12 DA13 DA14 FA11
FA12 FB07 FB12
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA02
4B063 QA13 QQ42 QR14 QR58 QR66
QS03 QS28 QS39 QX02

PAT-NO: JP02003189852A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 2003189852 A
TITLE: BASE SEQUENCE-DETERMINING APPARATUS AND BASE
SEQUENCE-DETERMINING METHOD
PUBN-DATE: July 8, 2003
INVENTOR-INFORMATION: NANBA, AKIHIRO; NIIMURA, HISANOBU; SAWADA, RYUJI;
TAKAHASHI, TAKEO
ASSIGNEE-INFORMATION: OLYMPUS OPTICAL CO LTD
APPL-NO: JP2001395308
APPL-DATE: December 26, 2001
INT-CL (IPC): C12N015/00, C12M001/00, C12M001/34, C12Q001/42, G01N033/50, G01N033/58
ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a base sequence-determining apparatus using a confocal microscope.

SOLUTION: This base sequence-determining apparatus using as an analysis sample a carrier on which a nucleic acid labeled with fluorescent substances in a state that the kinds of the fluorescent substances correspond to the kinds of bases comprises a measurement cell having a flow channel therein; a means for transporting a suspension of the carrier to which the nucleic acid of the analysis sample is adhered; a first laser light source and the first optical system for catching the carrier; a means for adding in the flow channel an enzyme solution for sequentially cleaving off mononucleotides constituting the nucleic acid from the terminal; a second laser light source and the second optical system for exciting in the cleavage order the fluorescent substances labeling the mononucleotide bases cleaved off with the enzyme solution; the third optical system for sequentially focusing fluorescent lights from the fluorescent substances; a light detector for sequentially detecting the focused fluorescent lights; and an analysis means for reading the base sequence of the nucleic acid from the identification signals outputted from the light detector.

FULL CONTENTS

[Claim(s)]

[Claim 1] [are equipment which judges the result obtained by a predetermined reaction by the existence of a fluorescent substance, /, and sowings, and / the carrier which is supporting the matter with which this reaction is presented / the condition of having caught by the optical trap] The measuring cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse in the equipment which performs a predetermined reaction to the matter with which this reaction is presented, The means for conveying the suspension of said carrier to the watercourse of said measuring cell, The first laser light source for catching said carrier, and the first optical system which condenses the optical beam from said first laser light source in the watercourse of said measuring cell, and catches said carrier, In order to judge the result obtained by said reaction to be a means for maintaining the fixed rate of flow to the watercourse of said measuring cell, and conveying to it the reaction mixture for making a predetermined reaction perform to the matter which said carrier supports The second laser light source for exciting this fluorescent substance reflecting a result, [signal / which the second optical system which condenses the optical beam from said second laser light source in the watercourse of said measuring cell, and excites said fluorescent substance, the third optical system which condenses the fluorescence from said fluorescent substance, the optical power detector which detects the fluorescence which condensed, and said optical power detector generated / discernment] Judgment equipment characterized by providing an analysis means to analyze the result of said reaction.

[Claim 2] The means for being equipment according to claim 1 and conveying the suspension of said carrier to the watercourse of said measuring cell, [and the reaction mixture for making a predetermined reaction perform to the matter which said carrier supports] Equipment characterized by providing the member by which each means for conveying to the watercourse of said measuring cell controls the flow of a liquid without making the liquid for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell piped and conveyed produce pulsating flow.

[Claim 3] The means for being equipment according to claim 1 or 2, and conveying the suspension of said carrier to the watercourse of said measuring cell, [and the reaction mixture for making a predetermined reaction perform to the matter which said carrier supports] Equipment characterized by for each means for conveying to the watercourse of said measuring cell having possessed piping for conveying each solution to the watercourse of a

measuring cell, and this piping having branched [near the passage inlet of a measuring cell] in the direction which goes to the watercourse of a measuring cell, and the direction which faces to waste fluid.

[Claim 4] It is base-sequence-determination equipment using the carrier to which the nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base and the class of fluorescent substance was made to adhere as a test sample for chemical analysis. The measuring cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse, The means for conveying the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, The first laser light source for catching the carrier to which said nucleic acid was made to adhere, The first optical system which catches the carrier to which condensed the optical beam from said first laser light source in the watercourse of said measuring cell, and said nucleic acid was made to adhere, The means for maintaining the fixed rate of flow to the watercourse of said measuring cell, and conveying to it the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end, The second laser light source for exciting the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid in order of cutting, The second optical system which condenses the optical beam from said second laser light source in the watercourse of said measuring cell, and excites said fluorescent substance in order of cutting, The optical power detector which detects the third optical system which condenses the fluorescence from the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of said nucleic acid one by one, and the fluorescence which condensed one by one, and generates the discernment signal corresponding to the detected fluorescence Base-sequence-determination equipment characterized by providing an analysis means to read the base sequence of said nucleic acid, from the discernment signal which said optical power detector generated.

[Claim 5] The means for being equipment according to claim 4 and conveying the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, [and the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end] Equipment characterized by providing the member by which each means for conveying to the watercourse of said measuring cell controls the flow of a liquid without making the liquid for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell piped and conveyed produce pulsating flow.

[Claim 6] The means for being equipment according to claim 4 or 5, and conveying the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, [and the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end] Equipment characterized by for each means for conveying to the watercourse of said measuring cell having possessed piping for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell, and this piping having branched [near the passage inlet of a measuring cell] in the direction which goes to the watercourse of a measuring cell, and the direction which faces to waste fluid.

[Claim 7] The light source for being equipment given in Claim 1 - any 1 term of six, and irradiating the illumination light in the watercourse of said measuring cell, The optical system which irradiates the light from said light source in the watercourse of said measuring cell, and irradiates the illumination light to said carrier, and under said illumination light Equipment characterized by providing further an optical system for said carrier picturizing the image caught by said first laser light source and an image pick-up means to picturize the image by which said carrier was caught.

[Claim 8] The nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base, and the class of fluorescent substance as a test sample for chemical analysis using the carrier made to adhere as a measuring cell The process which conveys the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is the base-sequence-determination method using the cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse, and is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, The process which catches in a watercourse the carrier to which said nucleic acid was made to adhere by a laser trap, The process which maintains the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes nucleic acid sequentially from an end, and passes the fixed rate of flow in said watercourse, The base-sequence-determination method characterized by providing the process which detects the fluorescence to which the fluorescent substance excited by the process excited in order and said process emits the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid one by one, and reads the base sequence corresponding to the detected fluorescence.

[Claim 9] The base-sequence-determination method according to claim 8 that the carrier to which said nucleic acid was made to adhere is characterized by providing further the process which picturizes the image caught by the laser trap.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the base-sequence-determination equipment which reads the base sequence of nucleic acid, and the method of determining the base sequence of nucleic acid. More concretely, this invention is in the condition which caught the carrier which is supporting nucleic acid by laser light, performs the reaction which cuts every one base of nucleic acid from an end, and relates to the equipment and the method the existence of a fluorescent substance,/, and sowings which carry out the sign of the base of nucleic acid determine a base sequence. Moreover, the base-sequence-determination equipment of this invention can perform a predetermined reaction, where the carrier which is supporting the arbitrary matter with which a reaction is presented is caught by laser light, and it can use it as equipment which judges the result obtained by this reaction by the existence of a fluorescent substance,/, and sowings.

[0002]

[Description of the Prior Art] As equipment which determines the base sequence of the nucleic acid of DNA or RNA conventionally, gel electrophoresis equipment, capillary-electrophoresis equipment, etc. are known. With gel electrophoresis equipment, if the migration length of a gel is lengthened, the base sequence of theoretic without limit long nucleic acid can be read. However, if migration length is lengthened, it has difficulties, like arrangement of a sample to which equipment becomes so large-scale takes time and effort and time. Moreover, [equipment] although capillary-electrophoresis equipment is excellent in the point that a lot of samples can be read at once, and the point which seldom requires time and effort for arrangement of a sample It is about 600-700 bases that it can read by one measurement, and it is difficult to read the base sequence of long nucleic acid.

[0003] moreover, the base sequence determination of nucleic acid -- the former -- radioisotope (RI) -- generally it was carried out using ³²P. Although the approach by RI is very high sensitivity, the consideration to environment is needed for the top where processing of radioactive waste etc. is troublesome.

[0004] On the other hand, there is microspectrophotometry as a method of observing internal structures, such as each DNA and a cell. This method adds a fluorochrome to a cell, observes fluorescence on the prepared slide of a microscope, and measures the internal condition and the structure of a cellular structure. This method cannot be read for reading a base sequence, either.

[0005] Moreover, the flow cytometry is well used as a measuring method of the living body cell in a fluid, or particulates. A flow cytometry enters light, such as laser light, in these object each, making particulates, such as a living thing cell and a latex particle, transport in a fluid. Subsequently, with the light-receiving machine placed in two or more directions, the diffuse light and fluorescence from the target cell or particulates are observed, and form, an internal structure, etc. of an object are measured. At high speed, in flowing fluid, one after another, although this method measures the diffuse light and fluorescence from a cell or particulates, it cannot detect a minute single molecule and cannot read a base sequence.

[0006] It entered in the 90s and the research on detection and imaging of the single molecule using fluorescence is increasing rapidly. For example, P.M.Goodwin et al., ACC.Chem.Res.1996, 29, the approach indicated to 607-613, fluorescence correlation spectroscopy (FCS), etc. are mentioned as a method of detecting a single molecule. In fluorescence correlation spectroscopy, the protein and the carrier particles which carried out fluorescent labeling are made to float in solution in the view of a confocal laser scanning microscope, and the fluctuation of fluorescence intensity based on Brownian movement of these particulates is analyzed. Thereby, the target numbers and magnitude, such as particulates, are measurable. This technique is discussed in detail by Masataka Kaneshiro "protein nucleic acid enzyme" (1999) Vol.44, No.9, and 1431-1437, for example. Only the information about the magnitude and the amount of particulates can be acquired by this method.

[0007] Moreover, the attempt which catches in a watercourse the latex particle to which DNA adhered by an optical trap, elongates adhering DNA, and measures the behavior and force is also performed (Steven B.Smith et al, Science (1996) Vol.271, 795-). Furthermore, in the system which conveys particulates all over a watercourse, each particle is caught by laser light (trap), and the equipment which controls by on--off of optical radiation the movement toward movement of particulates which carried out the trap, and prepares spacing of movement of the particulates conveyed is proposed (JP,5-296914,A). Thus, although indicated about the approach of catching

particulates by laser light etc. by the method of carrying out the optical trap of the particulates, the fluorescent substance made to adhere to particulates is not distinguished, or it is not indicated about the method which has measured the amount of a fluorescent substance enough and carries out it.

[0008] Moreover, the attempt which determines a base sequence is performed using a new approach. That is, it is the approach which separates one mononucleotide (base) at a time from the end of one chain of DNA, is fixed on a substrate, with the order held, changes this into a fluorescence inductor on a substrate, excites this with laser light, and is photoed and imaged with a video camera. This technique is stated to Ishikawa ** "protein nucleic acid enzyme" (1999) Vol.44, No13, and 2019-2023 in detail. However, this approach must change each base into a fluorescence inductor on a substrate. Moreover, holding turn certainly, each base separated on the substrate without a solvent must be made located in a line on a substrate, and handling of a substrate is very difficult.

[0009] When carrying out the label of the molecule of each request using a fluorescent substance and detecting and identifying it in solution generally, the method of passing cleaning fluid and a sample is used in the inside of this container using a reaction container. However, the fluorescent-labeling molecular size which flows through the watercourse in a reaction container was extremely small compared with the magnitude (the inside diameter or width of tubing) of a watercourse, and it was very difficult to identify and detect weak fluorescence by this certainly for every each until now.

[0010] On the other hand, Keller and others detects the fluorescence of the fluorescent-labeling molecule which flows in a minute watercourse for every each. By this [the base sequence of DNA] The principle of the approach to determine is proposed (Single-molecule fluorescence analysis in solution Appl.Spectroscopy, Vol.50, No.7, 1996, PP12A-32A). This proposal uses as a sample the thing which made DNA which carried out the sign of each base by the fluorochrome adhere to glass particles. It is the method of detecting the fluorescence from the fluorescence molecule which caught this sample with infrared laser light, passing the inside of a minute watercourse, poured the dialytic ferment to this watercourse, separated every one base of DNA, and was attached to each base. However, Keller and others remains only in an idea and has not made reference about composition required in order to actually embody this method.

[0011] Then, although Dorre and others succeeds in the attempt which makes the proposal of Keller and others concrete As stated also in the report It has come (Dorre K et al, Bioimaging 5, 139-152, 1997, Techniques for single molecule sequencing) to attain the last object of reading a base sequence. Thus, particulates are caught how concrete, the caught particulates are moved to a predetermined location until now, and it is not reported whether fluorescence is excited and measured. Moreover, it is not indicated concretely whether a sample solution, dialytic ferment liquid, cleaning fluid, etc. are also made to carry in and take out by what kind of mechanism. Furthermore, it is not indicated clearly how a base sequence is read by processing a fluorescence signal, either.

[0012]

[Problem to be solved by the invention] It aims at offering a means for this invention to have been made in view of the above-mentioned situation, and for the trouble of a nucleotide sequence which needs the separation operation by the conventional electrophoresis to have been improved and to realize a new nucleotide sequence concretely. Namely, this invention aims at offering the base-sequence-determination equipment and the base-sequence-determination method of carrying out sequencing of the nucleic acid of unrestricted length continuously and simple.

[0013]

[Means for solving problem] In order to attain the above-mentioned object, this invention offers a means to read the base sequence of nucleic acid as follows. First, the discernment sign of each base of a nucleic acid molecule to carry out sequencing is carried out with a fluorescent substance, and a test sample for chemical analysis is prepared by adhering this nucleic acid to a carrier. This test sample for chemical analysis is introduced into the watercourse of a measuring cell, and a carrier is caught with a laser. Subsequently, dialytic ferment liquid is poured to a watercourse in this condition, and the mononucleotide which constitutes nucleic acid is cut sequentially from an end. Under conditions into which the cut mononucleotide keeps the cut order and flows through the inside of a watercourse, the fluorescence which the fluorescent substance which is carrying out the sign of the base of a mononucleotide emits is detected one by one, and the base sequence of nucleic acid is read.

[0014] It is a means by which a sample solution, enzyme liquid, cleaning fluid, etc. can be especially conveyed to the watercourse of a measuring cell promptly, and this invention is proposed about a means by which the cutting order can be kept for the base of the nucleic acid cut with a dialytic ferment, and the inside of a watercourse can be made to convey.

[0015] That is, this invention was attained by the means of the description below.

[0016] (1) [are equipment which judges the result obtained by a predetermined reaction by the existence of a fluorescent substance,/, and sowings, and / the carrier which is supporting the matter with which this reaction is presented / the condition of having caught by the optical trap] The measuring cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse in the equipment which performs a predetermined reaction to the matter with which this reaction is presented, The means for conveying the suspension of said carrier to the watercourse of said measuring cell, The first laser light source for catching said carrier, and the first optical system which condenses the optical beam from said first laser light source in the watercourse of said measuring cell, and catches said carrier, In order to judge the result obtained by said reaction to be a means for maintaining the fixed rate of flow to the watercourse of said measuring cell, and conveying to it the reaction mixture for making a predetermined reaction perform to the matter which said carrier supports The second laser light source for exciting this fluorescent substance reflecting a result, [signal / which the second optical system which condenses the optical beam from said second laser light source in the watercourse of said measuring cell, and excites said fluorescent substance, the third optical system which condenses the fluorescence from said fluorescent substance, the optical power detector which detects the fluorescence which condensed, and said optical power detector generated / discernment] Judgment equipment characterized by providing an analysis means to analyze the result of said reaction.

[0017] The means for being equipment given in (2) and (1), and conveying the suspension of said carrier to the watercourse of said measuring cell, [and the reaction mixture for making a predetermined reaction perform to the matter which said carrier supports] Equipment characterized by providing the member by which each means for conveying to the watercourse of said measuring cell controls the flow of a liquid without making the liquid for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell piped and conveyed produce pulsating flow.

[0018] To (3), (1), or (2), are equipment of a description and [the watercourse of said measuring cell] [the reaction mixture for making a predetermined reaction perform to the means for conveying the suspension of said carrier, and the matter which said carrier supports] Equipment characterized by for each means for conveying to the watercourse of said measuring cell having possessed piping for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell, and this piping having branched [near the passage inlet of a measuring cell] in the direction which goes to the watercourse of a measuring cell, and the direction which faces to waste fluid.

[0019] (4) It is base-sequence-determination equipment using the carrier to which the nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base and the class of fluorescent substance was made to adhere as a test sample for chemical analysis. The measuring cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse, The means for conveying the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, The first laser light source for catching the carrier to which said nucleic acid was made to adhere, The first optical system which catches the carrier to which condensed the optical beam from said first laser light source in the watercourse of said measuring cell, and said nucleic acid was made to adhere, The means for maintaining the fixed rate of flow to the watercourse of said measuring cell, and conveying to it the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end, The second laser light source for exciting the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid in order of cutting, Condense the optical beam from said second laser light source in the watercourse of said measuring cell, and the second optical system which excites said fluorescent substance in order of cutting, the third optical system which condenses the fluorescence from the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of said nucleic acid one by one, and the fluorescence which condensed are detected one by one.

Base-sequence-determination equipment characterized by providing an analysis means to read the base sequence of said nucleic acid, from the discernment signal which the optical power detector which generates the discernment signal corresponding to the detected fluorescence, and said optical power detector generated.

[0020] The means for being equipment given in (5) and (4), and conveying the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, [and the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end] Equipment characterized by providing the member by which each means for conveying to the watercourse of said measuring cell controls the flow of a liquid without making the liquid for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell piped and conveyed produce pulsating flow.

[0021] To (6), (4), or (5), are equipment of a description and [the watercourse of said measuring cell] The means for conveying the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere, [and the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end] Equipment characterized by for each means for conveying to the watercourse of said measuring cell having possessed piping for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell, and this piping having branched [near the passage inlet of a measuring cell] in the direction which goes to the watercourse of a measuring cell, and the direction which faces to waste fluid.

[0022] (7) The light source for being equipment given in any 1 of (1) - (6), and irradiating the illumination light in the watercourse of said measuring cell, The optical system which irradiates the light from said light source in the watercourse of said measuring cell, and irradiates the illumination light to said carrier, and under said illumination light Equipment characterized by providing further an optical system for said carrier picturizing the image caught by said first laser light source and an image pick-up means to picturize the image by which said carrier was caught.

[0023] (8) The nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base, and the class of fluorescent substance as a test sample for chemical analysis using the carrier made to adhere as a measuring cell The process which conveys the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is the base-sequence-determination method using the cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse, and is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, The process which catches in a watercourse the carrier to which said nucleic acid was made to adhere by a laser trap, The process which maintains the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes nucleic acid sequentially from an end, and passes the fixed rate of flow in said watercourse, The base-sequence-determination method characterized by providing the process which detects the fluorescence to which the fluorescent substance excited by the process excited in order and said process emits the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid one by one, and reads the base sequence corresponding to the detected fluorescence.

[0024] (9) The base-sequence-determination method given in (8) characterized by the carrier to which said nucleic acid was made to adhere possessing further the process which picturizes the image caught by the laser trap.

[0025]

[Mode for carrying out the invention] This invention is explained in detail hereafter.

[0026] <Test sample for chemical analysis> The test sample for chemical analysis first used in order to read a base sequence with the base-sequence-determination equipment of this invention is explained. A test sample for chemical analysis "made the nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base, and the class of fluorescent substance adhere to a carrier" as it showed drawing 1 the example.

[0027] The "carrier" used by this invention will not be limited especially if caught by laser light. As a carrier, metal particulates, such as glass particles, a latex particle, and gold colloid particles, magnetic particulates, or a living body cell can use the arbitrary things of water-insoluble nature. Moreover, generally [the size] as for the carrier particles by which a laser trap is carried out, a thing 0.1 micrometer - 1 micrometer in diameter is used more preferably 0.05 micrometer - 2 micrometers in diameter 0.01 micrometer - 10 micrometers in diameter. As an example of a carrier, glass particles 1 micrometer in diameter can be mentioned. More specifically as glass particles 1 micrometer in diameter, the silica bead made from Bangs Laboratories Inc (U.S.) by which the streptoavidin coat was carried out can be used.

[0028] It will not be limited especially if it is detectable for the sign of the "fluorescent substance" to be carried out with the fluorescent substance concerned in this invention. For example, rhodamine Green (henceforth RG), tetramethyl rhodamine 5-isothiocyanate (It is also hereafter called TMR), Cy5 (Sypher Eve (registered trademark), Amersham Pharmacia bio-tech company), A fluorescein isothiocyanate (FITC), acridine yellow (Acridine Yellow), and the Texas red (Texas Red) can be used. However, when carrying out the discernment sign of each base using two or more kinds of fluorescent substances, each fluorescent substance distinguishes by the difference in the wavelength to emit, and needs to be detected.

[0029] Although an example "the nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base and the class of fluorescent substance" is indicated to be to drawing 1 as an example, i.e., DNA which carried out the discernment sign of four kinds of bases with four kinds of fluorescent substances, is given in this invention, it is not limited to this. That is, in this invention, "nucleic acid" refers to both DNA and RNA. Moreover, there may be a class of base by which does not mean carrying out the sign of four kinds of all bases, and fluorescent labeling

is not necessarily carried out to a "discernment sign" in it here. Moreover, the sign of two kinds or three kinds of different base kinds may be carried out with the same fluorescent substance.

[0030] The variation of such a discernment sign is illustrated by the below-mentioned concrete sample (drawing 16 , sample of 17 and 19). For example, you may carry out the discernment sign only of one kind of base (for example, adenine) among four kinds of bases of nucleic acid using one kind of fluorescent substance (refer to drawing 16). Or you may carry out the discernment sign of two kinds of bases using two kinds of fluorescent substances with which radiation wavelengths differ, respectively (refer to drawing 17). Or using two kinds of fluorescent substances with which radiation wavelengths differ, the sign of one kind of base may be carried out with one fluorescent substance, in addition the discernment sign of three kinds of bases may be carried out with the fluorescent substance of another side (refer to drawing 19).

[0031] "The nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base and the class of fluorescent substance" can be prepared as follows, for example. Here describes the example of preparation of the sample which carried out the discernment sign of the base of nucleic acid using two kinds of fluorescent substances.

[0032] First, the one DNA chain (or one RNA chain) with which the biotin sign of the five prime end was carried out, and the discernment sign of each base was carried out as matter made to adhere to a carrier is prepared. Namely, following reaction solution {50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10mM KCl, 15mM (NH_4) SO $_4$, 7mMMgSO $_4$, 0.005% Triton X-100, 10mM 2-Mercaptoethanol, Substrate (for example, RG-dTTP (you may use RG-dUTP instead), RG-dATP, TMR-dCTP, TMR-dGTP)} in which the biotin sign primer of 1pmol and 20microeach M carried out fluorescent labeling per reaction

To inside, add an one DNA chain (chain used as a mold), and extension enzyme, it is made to react at 37 degrees C for 30 minutes, and a sample is prepared. At this reaction, four kinds of mononucleotides by which fluorescent labeling was carried out are used as a substrate, and synthesis of a complementary DNA strand (or complementary RNA chain) takes place to an one DNA chain (chain used as a mold). The complementary DNA strand (or complementary RNA chain) compounded here is used for actual sequence analysis. Hereafter, this complementary DNA strand (or complementary RNA chain) is called Sample DNA (or the sample RNA), and is used as a sample. Thus, the sample DNA (or the sample RNA) to which the biotin sign of the five prime end was carried out, and the discernment sign of each base was carried out with the fluorescent substance and which has predetermined arrangement is prepared. However, conditions, such as composition of the buffer solution mentioned in the example of preparation and reaction temperature, are not limited to this description.

[0033] Subsequently, the reaction which makes the prepared sample DNA (or the sample RNA) adhere to a carrier is performed. What is depended on the avidin biotin reaction shown in drawing 1 as a means to make Sample DNA (or the sample RNA) adhere to a carrier is mentioned. However, if such an adhesion function is achieved, it will not be limited to this. The adhesion by an avidin biotin reaction uses the silica bead (that by which avidin was fixed on the surface of glass particles) of the above-mentioned product made by Bangs Laboratories Inc (U.S.) by which the streptoavidin coat was carried out. It is carried out by combining the above-mentioned sample DNA (or the sample RNA) with this. More, the above-mentioned silica bead and the above-mentioned sample DNA (or the sample RNA) can be added to the solution of 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.0M LiCl, and 0.1%(v/v) Tween20, and it can be made to be able to react to a detail at a room temperature, and can produce in it. However, conditions, such as composition of buffer solution and reaction temperature, are not limited to this description. Thus, if a test sample for chemical analysis is created using the reaction of 1 to 1 of avidin and a biotin, one DNA strand (or RNA chain) can be made to adhere to one carrier.

[0034] The test sample for chemical analysis which carried out the discernment sign of the base of nucleic acid used for the base-sequence-determination equipment of this invention can be prepared with an approach well-known in this way. About preparation of a test sample for chemical analysis, Zeno Foldes-Papp et al, Nucleosides & Nucleosides, 16 (5&6), Please also refer to a description of 781-787, 1997, and Exonuclease degradation of DNA studied by fluorescence correlation spectroscopy.

[0035] Below <base-sequence-determination equipment> [form of the 1st operation] explains the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 1st of this invention with reference to drawing 2 . The test sample for chemical analysis which carried out the discernment sign of the base of nucleic acid using one kind of fluorescent substance is used for the equipment of the form of this operation.

[0036] As shown in drawing 2 , the base-sequence-determination equipment of the form of this operation possesses the following composition. The measuring cell 1 which equipped the core with the watercourse and was equipped

with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse; [the watercourse of said measuring cell] The first laser light source 3 for catching the carrier to which the means 2; aforementioned nucleic acid for conveying the suspension of a carrier to which the nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere was made to adhere; The optical beam from said first laser light source is condensed in the watercourse of said measuring cell. The first optical system 4-10 which catches the carrier to which said nucleic acid was made to adhere; [the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end] The means 2 for conveying to the watercourse of said measuring cell; [the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid]. The second laser light source 11 for exciting in order of cutting; The optical beam from said second laser light source is condensed in the watercourse of said measuring cell. The second optical system 12-14, and 10 which excites said fluorescent substance in order of cutting; [the fluorescence from the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of said nucleic acid] The optical power detector 20 which detects the third optical system 10 which condenses one by one, and the fluorescence of which 15-19; condensing was done one by one, and generates the discernment signal corresponding to the detected fluorescence; [signal / which said optical power detector generated / discernment] The light source 24 for irradiating the illumination light in the watercourse of an analysis means 21 to read the base sequence of said nucleic acid - the 23; aforementioned measuring cell; The light from said light source is irradiated in the watercourse of said measuring cell. The optical systems 25, 26, 15, and 10 which irradiate the illumination light to the carrier to which said nucleic acid was made to adhere; under said illumination light The optical systems 10, 15, 27-29 for the carrier to which said nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere to picturize the image caught by said first laser light source; an image pick-up means 30 to picturize the image by which the carrier to which said nucleic acid was made to adhere was caught.

[0037] A confocal laser scanning microscope is used for the base-sequence-determination equipment of this invention. Thus, by making the optical system for detecting fluorescence into a confocal optical system, the base of the cut mononucleotide monad is decipherable one by one.

[0038] Catching the carrier which made nucleic acid support by laser light, the base-sequence-determination equipment of this invention performs the reaction which cuts the base of this nucleic acid from an end, and it can be used for it in order to read the base sequence of this nucleic acid. It is not limited to such an activity, but catch the carrier which made the matter with which a reaction is presented support by a laser trap, and a predetermined reaction is made to perform, and the base-sequence-determination equipment of this invention can also be used in order to obtain this reaction result. The arbitrary reactions which can judge the result from which a predetermined reaction is obtained by this reaction by the existence of a fluorescent substance,/, and sowings are said. For example, by making the immune body by which fluorescent labeling was carried out react to the carrier which is supporting the antigen, an antigen-antibody reaction may be performed and you may react hybridization by making the nucleic acid of 1 chain by which fluorescent labeling was carried out react to the carrier which is supporting the nucleic acid of 1 chain.

[0039] Each composition and the action concerning the form of operation of the first of base-sequence-determination equipment are hereafter explained in order of composition of having mentioned previously.

[0040] << measuring cell >> -- "the measuring cell 1 which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse" is explained first. An example of a measuring cell is shown in drawing 3 in detail. The perspective view in which drawing 3 (a) shows a measuring cell, the top view in which (b) shows the measuring cell of (a), and (c) are drawings showing a part of cross section which meets an A-A line.

[0041] The measuring cell 1 needs to be equipped with the transparent field (field of 1b) for equipping the core with Watercourse 1c, and making an optical beam penetrate into a watercourse first. An objective lens will be arranged at this transparent field (field of 1b) side, and laser light enters from theb [1] side.

[0042] Moreover, when the measuring cell 1 has been arranged to the base-sequence-determination equipment of this invention, it needs to equip with the watercourse the location where the focus of an objective lens doubles in a watercourse. In other words, the focus of an objective lens needs to set up suitably the thickness of the surface portion 1b which penetrates an optical beam so that it may double in a watercourse. Furthermore, in the measuring cell 1, when an optical beam is drawn into a watercourse, all the fields that light penetrates need to be flat so that optical refraction may not happen.

[0043] Furthermore, in this invention, since it is indispensable to keep the order for the mononucleotide cut sequentially from the end of the nucleic acid used as a sample, and to convey the inside of a watercourse, it is necessary to make the width of a watercourse, and the depth into suitable minute size.

[0044] When the above requirements are summarized, all the fields where the light which enters into ** watercourse, and the light emitted from a watercourse penetrate the measuring cell 1 are transparence, ** The width of that the monotonous thing for which the field which the light which enters into a watercourse, and the light emitted from a watercourse penetrate does not have the irregularity which has uniform thickness, and ** this plate have the suitable thickness doubled in a watercourse in the focus of an objective lens, and ** watercourse, and the depth need a minute thing. In addition, in this invention, transparence is a thing to the entering light and it is not necessarily in agreement with the transparence seen by the human eye.

[0045] In drawing 3, the measuring cell 1 consists of a body portion 1a and a transparent surface portion 1b which can penetrate laser light, and Watercourse 1c is formed between them. In addition, it cannot be overemphasized that a measuring cell is not limited to the composition which consists of such two portions. Although not limited especially as size of the measuring cell 1, it can be about considered as 1-25mm of the length directions of a watercourse, 5-15mm of cross direction of a watercourse, and 0.3-1mm of the depth directions (thickness) of a watercourse. For example, size of the measuring cell 1 can be made into about 10mm of the length directions of a watercourse, about 5mm of cross direction of a watercourse, and about 1mm of the depth directions (thickness) of a watercourse.

[0046] In drawing 3, the body portion 1a consists of a silicon wafer, and Watercourse 1c (slot) is formed in this body portion of etching etc. The thickness of the body portion 1a is 0.2-1mm preferably. Preferably, 5-100 micrometers, it is more desirable and the depth of 10-50 micrometers and a watercourse is desirable, and the width of a watercourse is 10-50 micrometers more preferably, for example, can be made into a depth of about 50 micrometers of 50 micrometers of **** of a watercourse, and a watercourse 5-100 micrometers. The length of a watercourse is 1-25mm preferably, for example, can be about 10mm. In addition, in drawing 3, the through hole is prepared in the silicon wafer by the both ends of a watercourse, and the inner tube for solution carrying in / taking out will be connected to this hole through 1d of contact buttons.

[0047] In drawing 3, the surface portion 1b serves as a transparent plate (glass cover) which consists of glass. Since the light emitted from the light which enters into a watercourse, and a watercourse as above-mentioned penetrates the surface portion 1b, it needs a transparent thing and the monotonous thing for which it has the same thickness without irregularity. Moreover, in order that the thickness of the surface portion 1b may affect the focal location of an objective lens as above-mentioned, a 0.13-0.21mm thing is desirable, and what is 0.169-0.171mm is more desirable. The surface portion 1b is joined to the body portion (silicon portion) 1a by methods, such as anode joining.

[0048] Moreover, the measuring cell 1 is not limited to the cell equipped with the above-mentioned watercourse, but the measuring cell of the minute shape of a hollow cylinder like a glass capillary or the measuring cell of the shape of a thin sheet can also be used for it.

[0049] In drawing 3, Watercourse 1c is an one straight-line-like slot, and when it pours the solution previously poured in this case, and different solution, it once needs to wash a watercourse with buffer solution etc. By branching a watercourse suitably and increasing it, such washing operation can also be performed efficiently. For example, a watercourse may be branched and a Y character type watercourse may be produced.

[0050] Moreover, although a measuring cell is, the watercourse, shape of i.e., a straight line, of form as shown in drawing 4 (top view of a measuring cell), it may have the watercourse of form where both the width and depth of the watercourse are narrow in the center section of the watercourse. The laser for carrier capture and the laser for excitation are irradiated at the portion which is narrow [this watercourse]. The width (shown all over [W2] drawing) and the depth of a portion which are narrow are 5-50 micrometers preferably. The length (shown all over [L] drawing) of the passage part which is narrow is 1-10mm preferably. Moreover, the width (shown all over [W1] drawing) and the depth of a portion which are not narrow as for a watercourse are 5-200 micrometers. Thus, conveyance of solution can make the difficult narrow range the minimum by narrowing the width and the depth of a watercourse only in the center section of the watercourse.

[0051] << solution carrying-in / taking-out mechanism >>, next the "means 2 for conveying the suspension of a carrier to which the nucleic acid which is a test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell" are explained. This means is also called solution carrying-in / taking-out mechanism, and shows drawing 5 the outline.

[0052] The Reason for having established such a solution carrying-in / taking-out mechanism in this invention is that it found out the following troubles to convey solution by the electroosmosis style (electro-osmotic flow: EOF) which Dorre and others proposes. That is, when conveying solution by an electroosmosis style, it is necessary to apply high voltage. Therefore, when it works by an electroosmosis style for a long time or the rate of flow is raised, there is a possibility that heat occurs in a watercourse, the activity of protein, such as enzyme, may fall especially or air bubbles may be generated. Therefore, a cure, such as cooling the perimeter of a watercourse, is needed. It becomes easy to generate heat and air bubbles, so that especially the watercourse of a reaction part is narrow.

[0053] Moreover, when solution carrying-in / taking-out mechanism is established like this invention and solution is conveyed by gravity or pump actuation, the flow of the liquid in a watercourse serves as "laminar flow", and it shows the rate-of-flow distribution to which flow becomes late as the flow of flow is the quickest near the center of a watercourse and it goes around a watercourse. However, in an electroosmosis style, the liquid in a watercourse becomes the flow called "plug flow", and the flow of the molecule (mononucleotide) conveyed may distribute it to the horizontal direction of the flow of the liquid in a watercourse etc. without concentrating on the center section of a watercourse. Thus, if a mononucleotide distributes into the perimeter portion of a watercourse, it will become difficult to identify the base of a mononucleotide which flows in a watercourse in a confocal field. Therefore, in consideration of such a trouble, it decided to establish solution carrying-in / taking-out mechanism in which it explains below by this invention.

[0054] The sample liquid (suspension of a carrier) used in this invention has that desirable to which the suspension of the carrier is carried out by predetermined concentration. That is, sample liquid is set as the suitable concentration by which one carrier tends to be caught by the laser trap. If carrier concentration is too high, another carrier will be caught behind the caught carrier, or possibility that the once caught carrier will be crawled off by other carriers which have flowed later will become high. Possibility of on the other hand catching if carrier concentration is too low becomes low. Therefore, generally the suspension containing 0.01 to 0.3 weight % of a carrier is used. For example, glass particles can use that by which the suspension is carried out to the phosphate buffer solution by 0.1 weight % of concentration.

[0055] In solution carrying-in / taking-out mechanism which drawing 5 shows, the measuring cell 1 is held in the electrode holder 1e. It is simpler to hold the measuring cell 1 in an electrode holder as above-mentioned, since the size is small, and to deal with it. The tank 2a for carrying in and the tank 2c for taking out are connected to each of 1d of jointing end children which was attached to the ends of this electrode holder 1e through the inner tube 2b for carrying in, and the inner tube 2d for taking out, respectively. The solution for conveying to a watercourse is filled by the tank 2a for carrying in. As solution, the buffer solution containing sample liquid (carrier suspension), the cleaning fluid in a watercourse (buffer solution), and dialytic ferment liquid is used. The thing of Teflon (registered trademark) construction material can be used for inner tubes 2b and 2d, for example.

[0056] About carrying in of the sample liquid from the tank 2a for carrying in to a watercourse etc., and taking out to the tank 2c for taking out, it can carry out by moving the height position of the upper and lower sides of both tanks. The flux to the watercourse of solution and the rate of flow are controllable by control of the height position of both tanks. Or a syringe etc. is directly driven using gas pressure and carrying in of solution and taking out can also be performed by performing attraction and discharge. In this case, the flux to the watercourse of solution and the rate of flow are controllable by control of gas pressure. Moreover, a motorised pump can also perform carrying in of solution and taking out.

[0057] The flux and the rate of flow to a watercourse of solution need to be carefully controlled by the following points. That is, when the rate of flow is too quick in this invention, in order that the carrier caught by the laser trap may escape, the rate of flow which is the grade in which a carrier does not escape from the condition by which the trap was carried out serves as a maximum. Thus, the maximum of the rate of flow is set up by a relation with the force (output of laser light) which is carrying out the laser trap of the carrier. Moreover, since the cut mononucleotide may move in the arbitrary directions by Brownian movement and a mononucleotide may stop locating in a line with the cut order when the rate of flow is too slow, the rate of flow of the grade which controls Brownian movement of a mononucleotide molecule at least is needed. Generally the rate of flow is set as 0.5 mm/s - 10 mm/s. For example, the rate of flow is set as 1 mm/s.

[0058] In embodying the composition of base-sequence-determination equipment, its attention was paid to solution carrying-in / taking-out mechanism in this invention. When embodying the composition of the base-sequence-determination equipment of this invention, it is because the following problems were newly found out. [the carrier in the condition (trap condition) of having been caught by the laser / with namely, a rapid change

(pulsating flow) of the rate of flow of a liquid] The problem that the problem of canceling a trap condition, and the mononucleotide cut with the dialytic ferment kept the cutting order, and was no longer conveyed in the inside of a watercourse by rapid change of the rate of flow of a liquid was found out. In addition, for exact reading of a base sequence made into the object of this invention, it becomes a problem of the utmost importance to keep the order for the mononucleotide cut sequentially from the end of nucleic acid, and to convey the inside of the watercourse of a measuring cell. Therefore, in order to solve these problems, this invention persons noted that it was necessary to add to making the width of the watercourse of a measuring cell, and the depth minute, and the conveyance of the solution in a watercourse needed to hold the fixed rate of flow. However, generally, if the width of a watercourse and the depth (inside diameter) are set to 1mm or less, conveyance of solution will become difficult. Therefore, this invention persons resulted in the idea that it is necessary to build solution carrying-in / taking-out mechanism which can convey solution smoothly in such a minute watercourse, and can maintain the fixed rate of flow.

[0059] As an example of solution carrying-in / taking-out mechanism which satisfies such requirements, concrete composition is mentioned to drawing 6 and drawing 7 . That is, in this invention, solution carrying-in / taking-out mechanism has the two following features preferably.

[0060] In order to convey solution smoothly to a minute watercourse, in the first place, this mechanism possesses piping for conveying each solution to the watercourse of a measuring cell, and is characterized by this piping having branched [near the passage inlet of a measuring cell] in the direction which goes to the watercourse of a measuring cell, and the direction which faces to waste fluid. In this Description, "piping" means all the tubing which forms the watercourse for discharging as waste fluid from the watercourse for leading solution to the watercourse of a measuring cell, and the watercourse of a measuring cell.

[0061] [here // near the passage inlet of a measuring cell / said piping which has branched in the direction which goes to the watercourse of a measuring cell, and the direction which faces to waste fluid] It is prepared in order to solve that it is difficult for the watercourse of a minute measuring cell to convey solution, and it has the meaning which assists conveyance of the solution to the watercourse of a measuring cell. Piping which goes in the direction of waste fluid functions in order to miss temporarily the solution conveyed to near the passage inlet of a measuring cell in the direction of waste fluid. Solution can be promptly conveyed ***** [near the passage inlet of a measuring cell] by pouring solution in the direction of waste fluid, changing the watercourse through which solution flows and once leading solution to the watercourse of a measuring cell after that. In addition, piping which goes in this direction of waste fluid may function, also in order to miss air in piping.

[0062] Near the passage inlet, the direction near the passage inlet of a measuring cell as much as possible is desirable in the meaning of assisting conveyance of the solution to the watercourse of a measuring cell here. It is desirable that the turning point of piping is specifically located in the place of less than about 10mm from a part for the terminal area which connects the watercourse and "piping" of a measuring cell (for example, contact button).

[0063] It is characterized by providing the member which controls the flow of the liquid which flows through the inside of piping, without making the liquid conveyed produce pulsating flow, in order to maintain the rate of flow with solution constant to the second with which solution carrying-in / taking-out mechanism flows through a watercourse. "The members which controls the flow of a liquid" is arbitrary members which it can be sufficient for, can carry out [can pour a liquid, can stop the flow, can change the watercourse of the liquid which flows through the inside of branched piping, or], and can control the flow of a liquid. Generally a valve can be used as this member.

[0064] in this invention, in order to maintain the flow of the solution of the fixed rate of flow in a watercourse, "the member (valve) which controls the flow of a liquid" was examined as follows, without making solution produce pulsating flow namely,. For example, the solenoid valve generally used is easy to come to hand, and excellent in the point which can control the action by a computer easily. However, if this solenoid valve is used for solution carrying-in / taking-out mechanism in this invention, when the action which controls the flow of a liquid is performed, a rapid volume change is caused, thereby, the fixed rate of flow cannot be maintained and solution cannot be conveyed to a watercourse. therefore -- changing the direction through which a liquid flows in branched piping in this invention **** -- etc. -- when the action which controls the flow of a liquid was performed, it found out that it was appropriate to use the valve which does not cause a rapid volume change. That is, when the action which controls the flow of a liquid was performed, it found out that it was appropriate to use the valve to which the flux of a liquid is changed gradually, for example, the valve which controls the flow of solution by revolution, (for an adjustment valve to be specifically desirable). However, without making a liquid produce pulsating flow, when the action which controls the flow of a liquid is performed, the valve used in this invention will not be limited,

especially if it is possible to maintain the flow of the solution of the fixed rate of flow. That is, it will not be limited, if the mononucleotide cut sequentially from the end of Sample DNA (or the sample RNA) by maintaining flow in the solution of the fixed rate of flow keeps the order and may have the inside of a watercourse conveyed.

[0065] Solution carrying-in / taking-out mechanism in which it has such a feature possesses piping which branched the example as shown in drawing 6 and drawing 7, a valve, and T type joint, and, thereby, can carry in and take out each solution to a minute watercourse smoothly efficiently. Furthermore, this mechanism can maintain the fixed rate of flow by using the specific (that is, pulsating flow of a liquid not being caused) valve which does not produce a volume change rapid at the time of conveyance of solution.

[0066] In addition, solution carrying-in / taking-out mechanism in which it explains in this Description can be used when carrying in arbitrary liquids to the cell equipped with the minute watercourse.

[0067] The concrete example of solution carrying-in / taking-out mechanism is hereafter explained in detail with reference to drawing 6. However, if solution carrying-in / taking-out mechanism in this invention can maintain the fixed rate of flow and solution can be conveyed to a minute watercourse, it cannot be overemphasized that it is not limited to the example shown in drawing 6.

[0068] [solution carrying-in / taking-out mechanism shown in drawing 6] It consists of the dialytic ferment introduction syringe 44, the sample introduction syringe 45, the buffer solution tanks (Buffer tank) 46 and 47, valves 1-9, T type joints 48 and 49, a negative pressure pump 52, a waste fluid tank (Waste tank) 53, and piping that connects these.

[0069] In addition, in drawing 6, piping of solution carrying-in / taking-out mechanism is connected with the watercourse of the measuring cell 1 through the contact buttons 50 and 51. Thus, since the width of a measuring cell of the watercourse is very narrow, it is desirable to install in an exchangeable condition through the contact buttons 50 and 51 in consideration of washing after pouring sample liquid taking time. In subsequent description, the watercourse in a measuring cell and the watercourse besides a measuring cell are called in distinction from "the watercourse of a measuring cell", and "the watercourse of piping" bordering on a contact button, respectively. Piping consists of Teflons, for example.

[0070] Each component part of solution carrying-in / taking-out mechanism shown in drawing 6 is explained.

[0071] From the {syringe and buffer solution tank} dialytic ferment introduction syringe 44 and the sample introduction syringe 45, dialytic ferment liquid and sample liquid are poured into "the watercourse of piping", respectively. The buffer solution tanks 46 and 47 for diluting dialytic ferment liquid and sample liquid, or washing the watercourse through which solution flows are installed in the dialytic ferment introduction syringe 44 and the sample introduction syringe 45, respectively.

[0072] In addition, in drawing 6, dialytic ferment liquid is conveyed from the left in the inside of the watercourse of a measuring cell on the right (the direction of a valve 4 to the valve 2), and sample liquid is conveyed from the right in the inside of the watercourse of a measuring cell on the left (the direction of a valve 2 to the valve 4). It is not limited to the example shown in drawing 6, but you may install each syringe and a buffer solution tank so that dialytic ferment liquid and sample liquid may both be flowed through the inside of the watercourse of a measuring cell toward a uniform direction. However, when dialytic ferment liquid flows through the inside of the watercourse of a measuring cell, the laser for carrier capture (inside of drawing, Traplaser) is irradiated by the upstream, and the laser for excitation (inside of drawing, Excitationlaser) needs to be downstream irradiated from it. That is, dialytic ferment liquid acts on the carrier (nucleic acid is supported) caught by the laser for carrier capture upstream of a watercourse first, and the sign nucleotide subsequently cut by this operation needs to be excited by the laser for excitation downstream from a watercourse.

[0073] choosing the direction through which a liquid flows in piping which took up the watercourse through which a liquid flows in piping of {valve and T type joint} solution carrying-in / taking-out mechanism, opened wide, or branched **** -- etc. -- the valve is installed in order to control the flow of solution. In drawing 6, valves 1-9 are a method valve of two, or a method valve of three, NO currently displayed on the valve means Normal Open (it usually opens) among drawing, NC means Normal Close (it usually intercepts), and COM means Common (common). A valve uses preferably what does not start pulsating flow as above-mentioned.

[0074] On the other hand, T type joint is used in order to form piping which generally branched. It functions in order to form piping to which it branched in the direction where T type joints 48 and 49 go to the watercourse of a measuring cell [near the passage inlet of a measuring cell] in drawing 6, and the direction which faces to waste fluid. That is, the solution which wants to convey T type joints 48 and 49 in the watercourse of a measuring cell by missing temporarily the solution of the watercourse of a measuring cell which it installed in the neighborhood very

much, and piping was branched, and was conveyed to near the passage inlet of a measuring cell on a waste fluid tank can be promptly led to near the entrance of a watercourse. Thereby, conveyance of solution can assist conveyance of the solution to the watercourse of a difficult measuring cell. For example, T type joint 48 can be located in the location where the thing of the contact button 50 made to be located as much as possible in the neighborhood was desirable, for example, separated from the contact button 50 about 20mm. Similarly T type joint 49 can be located in the location where the thing of the contact button 51 made to be located as much as possible in the neighborhood was desirable, for example, separated from the contact button 51 about 20mm.

[0075] Here, as for all the inside diameters of "the watercourse of piping", it is desirable to have width to some extent larger than the channel width (for example, 50 micrometers) of a measuring cell. Thus, in order to convey solution smoothly, rather than the channel width of a measuring cell, it is desirable to make the channel width of piping large, for example, it can set preferably 50-800 micrometers of channel width to about 250 micrometers. On the other hand, it is necessary to make the width of the watercourse of a measuring cell, and the depth minute as above-mentioned (for example, 50 micrometers) so that the object of the base sequence determination of this invention may be suited.

[0076] Furthermore, piping has branched in the direction in which solution carrying-in / taking-out mechanism shown in drawing 6 faces to the direction which goes to the watercourse of a measuring cell in each part in which the valve 4 and the valve 2 are installed, and waste fluid. Also in the installation place of a valve 4 and a valve 2, even this valve can lead solution to convey in the watercourse of a measuring cell promptly by branching piping and missing solution on a waste fluid tank temporarily. Thereby, conveyance of the solution to the watercourse of a measuring cell can be assisted.

[0077] For example, a valve 4 can be located in the location distant from the contact button 50 about 200mm, and the valve 2 can locate it in the location distant from the contact button 51 about 200mm. In addition, an additional post of piping which conveys solution on a waste fluid tank from a valve 48, and piping which conveys solution on a waste fluid tank from a valve 4 can also be made to hold for piping of one like below-mentioned drawing 7. An additional post of piping which conveys solution on a waste fluid tank from a valve 49, and piping which conveys solution on a waste fluid tank from a valve 2 can also be made similarly to hold for piping of one.

[0078] The {negative pressure pump} negative pressure pump 52 functions in order to lead solution to the waste fluid tank 53 by attraction. However, solution can also be led to a waste fluid tank with gravity without using a negative pressure pump. Although solution can be efficiently conveyed for the inside of the watercourse where it is minuter to use a negative pressure pump, solution is conveyed with gravity without a pump to avoid the effect of vibration of a pump. It is more desirable not to use a pump in this invention, since all subsequent operations avoid vibration if a carrier is caught by a laser in the watercourse of a measuring cell.

[0079] Next, solution carrying-in / taking-out mechanism explains the action which carries in each solution (sample liquid, dialytic ferment liquid, buffer solution) in the watercourse of a measuring cell.

[0080] Preferably, before carrying in each solution to a watercourse, it carries out deaeration processing.

[0081] First, sample liquid is conveyed in the watercourse of a measuring cell, and, subsequently to the inside of sample liquid, the carrier contained in the watercourse of a measuring cell is caught with the laser for carrier capture (Trap laser). Carriers other than the caught carrier are washed away and washed out of the watercourse of a measuring cell. Subsequently, dialytic ferment liquid is conveyed in the watercourse of a measuring cell, and the mononucleotide of the nucleic acid which a carrier supports is cut sequentially from an end. The fluorescent substance which is carrying out the sign of the mononucleotide is excited with the laser for excitation (Excitation laser), and the class (namely, class of base) of fluorescent substance is read. The sample liquid which finished measurement is taken out to the waste fluid tank 53 by pouring buffer solution.

[0082] It explains in detail hereafter.

[0083] A) Conveyance of buffer solution (A-1) A valve 8 is opened, a valve 1 is made into the NC side (COM and NC are connected), and a valve 2 is made into the NO side (COM and NO are connected). The buffer solution tank 47 is pushed up upwards, and buffer solution is led to a waste fluid tank with gravity.

[0084] (A-2) Lead buffer solution to a waste fluid tank via T type joint 49 by making a valve 2 into the NC side, making a valve 5 into the NO side, and pushing up the buffer solution tank 47 upwards. At this time, a valve 5 is made into the NC side, a valve 7 may be made into the NC side, and may be attracted with a negative pressure pump, a valve 5 may be made into the NO side, and it may lead to a waste fluid tank with gravity, or any are sufficient. Even T type joint 49 can lead solution promptly by operation of (A-1) and (A-2).

[0085] (A-3) Convey buffer solution in the watercourse of a measuring cell by closing a valve 5, opening a valve 6

wide, and pushing up the buffer solution tank 47 upwards. The buffer solution which flowed through the watercourse of the measuring cell is led to a waste fluid tank through the valve 6 opened wide. At this time, a valve 6 is made into the NC side, a valve 7 may be made into the NO side, and may be attracted with a negative pressure pump, a valve 6 may be made into the NO side, and it may lead to a waste fluid tank with gravity, or any are sufficient.

[0086] (A-4) Open a valve 9, make a valve 3 into the NC side, and make a valve 4 into the NC side. A valve 6 is made into the NO side, the buffer solution tank 46 is pushed up upwards, and buffer solution is led to a waste fluid tank with gravity. At this time, a valve 6 is made into the NC side, a valve 7 may be made into the NO side, and may be attracted with a negative pressure pump, a valve 6 may be made into the NO side, and it may lead to a waste fluid tank with gravity, or any are sufficient.

[0087] (A-5) Make a valve 4 into the NO side, push up the buffer solution tank 46 upwards, and lead buffer solution to a waste fluid tank with gravity. The inside of all the piping is filled with buffer solution by the above (A-1) of - (A-5), and operation.

[0088] B) Make the charge valve 1 of a sample into the NO side, make a valve 2 into the NC side, and close a valve 5. Sample liquid (for example, a glass bead suspension, 1 micrometer of particle diameters, 0.1 weight % of concentration) is led to the watercourse of a measuring cell by opening a valve 6 wide and pushing in the piston of a syringe 45. The sample liquid passing through the watercourse of the measuring cell makes a valve 6 the NC side, makes a valve 7 the NO side, and leads it to a waste fluid tank by drawing in with a negative pressure pump. In addition, you may lead sample liquid to a waste fluid tank with gravity.

[0089] C) Washing of carriers other than the caught carrier (B/F separation)

After catching a carrier with the laser for carrier capture, a valve 1 is made into the NC side, the buffer solution tank 47 is pushed up upwards, buffer solution is led to the watercourse of a measuring cell, and the carrier in a watercourse which was not caught is flushed. At this time, a valve 6 is made into the NC side, a valve 7 may be made into the NO side and may be attracted with a negative pressure pump, and a valve 6 may be made into the NO side and may be led to a waste fluid tank with gravity. However, since it may be washed away by the carrier caught by the vibration, the activity of a pump does not have it. [desirable] Carriers other than the carrier caught by laser light are flushed by this operation, and the inside of the watercourse of a measuring cell is washed.

[0090] D) Close the conveyance valve 9 of dialytic ferment liquid, make a valve 3 into the NO side, make a valve 4 into the NC side, and close a valve 6. Dialytic ferment liquid is led to the watercourse of a measuring cell by opening a valve 5 wide and pushing in the piston of a syringe 44. The dialytic ferment liquid which passed through the watercourse of the measuring cell makes a valve 5 the NC side, makes a valve 7 the NC side, and by drawing in with a negative pressure pump, it may be led to a waste fluid tank and it may lead it to a waste fluid tank with gravity. However, in this operation, since it may be washed away by the carrier caught by vibration of a pump, the activity of a pump is not desirable.

[0091] E) A valve 9 is opened after cutting of each base of the nucleic acid by the washing dialytic ferment of a watercourse, a valve 3 is made into the NC side, and a valve 4 is made into the NC side, close a valve 6, push up the buffer solution tank 46 upwards, and lead buffer solution to the watercourse of a measuring cell. This operation washes a watercourse. This washing operation can make a valve 5 the NC side, and can be efficiently performed by making a valve 7 into the NC side and attracting it with a negative pressure pump.

[0092] Subsequently, another example of solution carrying-in / taking-out mechanism is explained with reference to drawing 7 . Fundamentally, this example is the same as the example shown in drawing 6 , and gives the same code to the same composition. [solution carrying-in / taking-out mechanism shown in drawing 7] [the dialytic ferment introduction syringe 44, the sample introduction syringe 45, the buffer solution tanks (Buffer tank) 46 and 47, valves 21-25, T type joints 48, 49, 54, and 55, the negative pressure pump 52, the waste fluid tank (Waste tank) 53, and these] It consists of piping to connect.

[0093] Solution carrying-in / taking-out mechanism shown in drawing 7 possesses branched piping, a valve, and T type joint as well as the example shown in drawing 6 , and, thereby, can carry in and take out each solution to a minute watercourse smoothly efficiently. Moreover, this mechanism can maintain the fixed rate of flow similarly by using the specific (that is, pulsating flow of a liquid not being caused) valve which does not produce a volume change rapid at the time of conveyance of solution.

[0094] Moreover, like the example shown in drawing 6 , [near the passage inlet of a measuring cell], T type joints 48 and 49 are functioning in order to form piping which branched in the direction which goes to the watercourse of a measuring cell, and the direction which faces to waste fluid. Solution to convey in the watercourse of a measuring

cell can be promptly led to near the passage inlet of a measuring cell by missing solution on a waste fluid tank temporarily using this branched piping. Thereby, conveyance of solution can assist conveyance of the solution to the watercourse of a difficult measuring cell. For example, T type joint 48 can be located in the location distant from the contact button 50 about 20mm, and T type joint 49 can locate it in the location distant from the contact button 51 about 20mm.

[0095] Moreover, like the example shown in drawing 6, it is desirable to make the channel width of piping besides a measuring cell larger than the channel width in a measuring cell (for example, 50 micrometers), when conveying solution smoothly.

[0096] Below, the action of solution carrying-in / taking-out mechanism shown in drawing 7 is explained.

[0097] A) Fill the inside of all the watercourses with buffer solution by the following operation before the conveyance sample charge of buffer solution.

[0098] (A-1) Open a valve 21 and make a valve 23 into the NO side. The buffer solution tank 47 is pushed up upwards, and buffer solution is led to a waste fluid tank with gravity. At this time, a valve 23 is made into the NC side, a valve 25 may be made into the NC side, and may be attracted with a negative pressure pump, a valve 23 may be made into the NO side, and it may lead to a waste fluid tank with gravity, or any are sufficient. By this operation, even T type joint 49 can lead solution promptly.

[0099] (A-2) Convey buffer solution in the watercourse of a measuring cell by closing a valve 23, making a valve 24 into the NC or NO side, and pushing up the buffer solution tank 47 upwards. The buffer solution which flowed through the watercourse of the measuring cell is led to a waste fluid tank through a valve 24. At this time, a valve 24 is made into the NC side, a valve 25 may be made into the NO side, and may be attracted with a negative pressure pump, a valve 25 may be made into the NO side, and it may lead to a waste fluid tank with gravity, or any are sufficient.

[0100] (A-3) A valve 22 is opened, make a valve 24 into the NC or NO side, push up the buffer solution tank 46 upwards, and lead buffer solution in the direction of a waste fluid tank with gravity. At this time, a valve 24 is made into the NC side, a valve 25 may be made into the NO side, and may be attracted with a negative pressure pump, a valve 24 may be made into the NO side, and it may lead to a waste fluid tank with gravity, or any are sufficient. The inside of all the watercourses is filled with buffer solution by the above (A-1) of - (A-3), and operation.

[0101] B) Lead sample liquid (for example, a glass bead suspension, 1 micrometer of particle diameters, 0.1 weight % of concentration) to the watercourse of a measuring cell by closing the charge valve 21 of a sample, closing a valve 23, opening a valve 24 wide, and pushing in the piston of a syringe 45. The sample liquid passing through the watercourse of the measuring cell makes a valve 24 the NC side, makes a valve 25 the NO side, and leads it to a waste fluid tank by drawing in with a negative pressure pump. In addition, you may lead sample liquid to a waste fluid tank with gravity.

[0102] C) Washing of carriers other than the caught carrier (B/F separation)

After catching a carrier by laser light, a valve 21 is opened, the buffer solution tank 47 is pushed up upwards, buffer solution is led to the watercourse of a measuring cell, and the carrier in a watercourse which was not caught is flushed. At this time, a valve 24 is made into the NC side, a valve 25 may be made into the NO side and may be attracted with a negative pressure pump, and a valve 24 may be made into the NO side and may be led to a waste fluid tank with gravity. However, since it may be washed away by the carrier caught by the vibration, the activity of a pump does not have it. [desirable] Carriers other than the carrier caught by laser light are flushed by this operation, and the inside of the watercourse of a measuring cell is washed.

[0103] D) Lead dialytic ferment liquid to the watercourse of a measuring cell by closing the conveyance valve 22 of dialytic ferment liquid, closing a valve 24, opening a valve 23 wide, and pushing in the piston of a syringe 44. The dialytic ferment liquid which passed through the watercourse of the measuring cell makes a valve 23 the NC side, makes a valve 25 the NC side, and by drawing in with a negative pressure pump, it may be led to a waste fluid tank and it may lead it to a waste fluid tank with gravity. However, in this operation, since it may be washed away by the carrier caught by vibration of a pump, the activity of a pump is not desirable.

[0104] E) A valve 22 is opened after cutting of each base of the nucleic acid by the washing dialytic ferment of a watercourse, and a valve 24 is closed, push up the buffer solution tank 46 upwards, lead buffer solution to the watercourse of a measuring cell, and wash a watercourse. At this time, a valve 23 can be made into the NC side and a watercourse can be efficiently washed by making a valve 25 into the NC side and attracting it with a negative pressure pump.

[0105] Laser light source for << carrier capture >>, next the "first laser light source 3 for catching the carrier to which said nucleic acid was made to adhere" are explained. The laser (henceforth the laser for carrier capture) which acts as Idei can be suitably chosen from the first laser light source about the class and a radiation wavelength according to the size of a carrier to catch. Or after choosing the laser for carrier capture, you may choose the size of the carrier caught by the laser.

[0106] If the laser used in this invention is idiomatically used by a laser trap, it will not be limited, but generally a laser (488nm (argon laser) - 1064nm (Nd: YAG laser)) can be used for it. For example, a Cr.LiSAF laser with a wavelength of 855nm can be used. Or Nd: You may use infrared solid-state lasers, dye laser, etc., such as an YAG laser. The laser of an infrared region with a wavelength of 700nm or more is used preferably. For example, in order to catch glass particles 1 micrometer in diameter by a laser trap, a Cr.LiSAF laser with an output [300mW] of 855nm can be used.

[0107] in addition, [relation / between the wavelength of a laser, and the particle size caught] It is W.H.Wright, G.J.Sonek, and M.W.Berns, Appl.Phys.Lett., and Vol.63 in detail. (6), Please refer to a description of 1993 and Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezers.

[0108] If the output of the laser for carrier capture is high, the force which catches a carrier so much becomes strong, and although it is desirable, there is evil in which damage is done to the dialytic ferment which cuts from an end the base which constitutes equipment (objective lens), and a test sample for chemical analysis and nucleic acid. therefore, an output is highly set up to the grade which does not bring about such evil (desirable -- less than 2W). In order to catch a carrier generally, a 100-1000mW laser output is used.

[0109] << first optical system >> -- subsequently "the first optical system 4-10 which catches the carrier to which condensed the optical beam from said first laser light source in the watercourse of said measuring cell, and said nucleic acid was made to adhere" is explained. This optical system consists of a collimate lens 4, the beam expander 5, a lens 6, a mirror 7, a lens 8, a die clo IKKU half mirror 9, and an objective lens 10. These optical systems 4-10 are arranged at this order on the light path of the optical beam which acts as Idei from the laser for carrier capture.

[0110] In the equipment of this invention, the condensing optical system by an objective lens is a confocal optical system, and the focus of the laser light is carried out to the very narrow field decided by the numerical aperture (NA) of an objective lens. For example, the numerical aperture (NA) of the objective lens used for the equipment of this invention is 0.9.

[0111] The optical beam of the laser for carrier capture is made into a collimated beam with a collimate lens 4, and enlarges a beam diameter with the beam expander 5. Then, after making it condense on the 7th page of a mirror with a lens 6 and making it parallel light with a lens 8, a light path is bent with the die clo IKKU half mirror 9, and it is led to the objective lens 10. The predetermined location in the watercourse of the measuring cell 1 is made to condense the optical beam through the objective lens 10.

[0112] The capture location in the watercourse of a carrier can be adjusted about the length direction of a watercourse by changing the include angle of a mirror 7. Moreover, the capture location is controllable by movement of the direction of an optical axis of the objective lens 10 about the direction of an optical axis. Thus, it becomes possible to carry out adjustment and control and to irradiate the laser for carrier capture in the predetermined location in a watercourse. Although decided by physical relationship with the laser for excitation at the time of base sequence analysis, this is later mentioned for a predetermined location here.

[0113] In addition, when irradiating the laser for carrier capture and catching a carrier, sample liquid may be flowing the inside of a watercourse and it is not necessary to flow.

[0114] The optical beam which made it condense in a watercourse as mentioned above can catch one carrier which moves in accordance with flow in the inside of a watercourse. The situation is shown in drawing 8 . After being condensed with the objective lens 10, the optical beam of the laser for carrier capture penetrates the surface portion 1b of the measuring cell 1, and a focus is carried out to the center portion of the solution in Watercourse 1c, and it irradiates the suspension of a carrier, as shown in drawing 8 . This catches one carrier in a watercourse.

[0115] << enzyme liquid conveyance means >>, next "the means for conveying the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes said nucleic acid sequentially from an end to the watercourse of said measuring cell" are explained. The means for pouring enzyme liquid can be shared with the means 2 for conveying the suspension of a carrier with the form of this operation. Therefore, please also refer to the above-mentioned description about solution carrying-in / taking-out mechanism.

[0116] When the nucleic acid used as the sample "is cut sequentially from an end" here has adhered to the carrier

in the five prime end side, it means cutting the mononucleotide which constitutes nucleic acid sequentially from a three-dash terminal. On the contrary, when the nucleic acid used as a sample has adhered to the carrier in the three-dash terminal side, it means cutting the mononucleotide which constitutes nucleic acid sequentially from a five prime end.

[0117] "Enzyme liquid" can choose suitably the exonuclease which cuts one mononucleotide at a time only from 3' exonuclease [which cuts one mononucleotide at a time only from a side] or 5' side. For example, Exonuclease I and T7 polymerase can be used. Although the enzyme activity which enzyme liquid has is suitably set up within limits which perform a desired decomposition reaction, the enzyme liquid which has the activity of 10 - 200nM is preferably used for it.

[0118] In solution carrying-in / taking-out mechanism shown in drawing 5 , enzyme liquid is poured by the predetermined rate of flow from the tank 2a for carrying in to a watercourse, and is discharged from a watercourse to the tank 2c for taking out. In order to pour enzyme liquid by the predetermined rate of flow to a watercourse as above-mentioned, it can carry out by controlling the height position of the upper and lower sides of both tanks, or controlling the gas pressure of a syringe. Moreover, a motorised pump can also perform carrying in of solution and taking out.

[0119] Since it is required by this invention that the order should be kept for the mononucleotide cut sequentially from the end, and the inside of a watercourse should be conveyed, in conveyance of enzyme liquid, keeping the predetermined rate of flow steady has an important meaning, as explained previously. When the rate of flow is too quick in this invention, in order that the particles caught by the laser trap may escape, the rate of flow which is the grade in which particles do not escape from the condition by which the trap was carried out serves as a maximum. Moreover, since the cut mononucleotide may move in the arbitrary directions by Brownian movement and a mononucleotide may stop locating in a line with the cut order when the rate of flow is too slow, the rate of flow of the grade which controls Brownian movement of a mononucleotide molecule at least is needed. In order to raise the analytic accuracy of the base sequence of nucleic acid, in the range in which the particles caught do not escape, the quicker one of the rate of flow is desirable. That is, the rate of flow is set up by a relation with the force (laser output) which is carrying out the laser trap of the particles. Generally the rate of flow is set as 0.5 mm/s - 10 mm/s. For example, the rate of flow is set as 1 mm/s.

[0120] Laser light source for << excitation >>, next the "laser light source 11 for excitation for exciting the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid in order of cutting" are explained. Generally the laser for excitation has the wavelength of the visible range, and what has the wavelength which excites the used fluorescent substance is used for it. For example, when rhodamine Green is used as a fluorescent substance and TMR is used for a solid blue laser (473nm), argon laser (514.5nm) is used.

[0121] In addition, with the form of this operation, the laser light source for excitation will use only one kind of fluorescent substance which only the number of is one, therefore is excited by the laser light source concerned for the sign of a nucleobase.

[0122] << second optical system >>, then the "second optical system 12-14, and 10 which condenses the optical beam from the laser light source for excitation in the watercourse of said measuring cell, and excites said fluorescent substance in order of cutting" are explained. This optical system consists of a collimate lens 12, a beam expander 13, a die clo IKKU half mirror 14, and an objective lens 10. These optical systems 12-14, and 10 are arranged at this order on the light path of the optical beam which acts as Idei from the laser light source 11.

[0123] After the optical beam from the laser light source 11 for excitation is made into a collimated beam with a collimate lens 12 and enlarges a beam diameter with the beam expander 13, it bends a light path with the die clo IKKU half mirror 14, and is led to the objective lens 10. The predetermined location in the watercourse of the measuring cell 1 is made to condense the optical beam through the objective lens 10.

[0124] The radiation location in the watercourse of the laser for excitation can be adjusted about the length direction of a watercourse by changing the include angle of the die clo IKKU half mirror 14. Moreover, the radiation location is controllable by movement of the direction of an optical axis of the objective lens 10 about the direction of an optical axis. Thus, it becomes possible to carry out adjustment and control and to irradiate the laser for excitation in the predetermined location in a watercourse.

[0125] Therefore, with the form of this operation, it condenses with one objective lens 10, and the focus of both the optical beam of the above-mentioned laser for carrier capture and the optical beam of the laser for excitation is carried out into the watercourse of the measuring cell 1.

[0126] In this invention, the optical beam of the laser for carrier capture and the optical beam of the laser for excitation need to be irradiated by predetermined physical relationship in the watercourse of a measuring cell at the time of base sequence analysis. Specifically, both beams need to be irradiated in the watercourse in the condition that it is shown in drawing 9 , at the time of base sequence analysis. That is, a carrier needs to be caught by the laser for carrier capture upstream of the watercourse through which solution is flowing, and the laser for excitation needs to be irradiated in the lower stream. It becomes possible to excite the fluorescent substance which the mononucleotide which constitutes the nucleic acid supported by the carrier is made to flow into the cut order one by one in the irradiation area of the laser for excitation, and is subsequently carrying out the sign of the base of a mononucleotide according to such predetermined physical relationship one by one (refer to drawing 9).

[0127] Therefore, it is required to set up the light path of the optical beam beforehand, or to move the beam of at least 1 of the laser beam for carrier capture or the laser beam for excitation to a suitable location before analysis so that both laser beams may be irradiated by the above-mentioned predetermined physical relationship at the time of base sequence analysis. With the form of this operation shown in drawing 2 , control of such a light path of an optical beam is performed by the optical system (specifically the die clo IKKU half mirror 9 or the die clo IKKU half mirror 14) for irradiating an optical beam.

[0128] Especially if the predetermined location of both the laser beams at the time of base sequence analysis is located in the location which both lasers left in the objective lens view, it will not be limited, but it is located in the location which both lasers left most within the objective lens view preferably (leaving about 25 micrometers).

[0129] Thus, it is possible to make the distant predetermined location condense two laser beams with one objective lens with the form of this operation. However, the base-sequence-determination equipment of this invention is not limited to the mode which makes the location which left two optical beams with one objective lens condense, but may assemble equipment with two objective lenses (see the form and drawing 13 of the 4th operation which are mentioned later).

[0130] << third optical system >>, next the "third optical system 10, 15-19 which condenses the fluorescence from the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of said nucleic acid one by one" are explained. This optical system consists of the objective lens 10, a lens 15, an aperture 16, a condenser 17, an Ir cut off filter 18, and a band pass filter 19. These optical systems 15-19 are arranged at this order on the light path of the fluorescence emitted from a fluorescent substance. In addition, in drawing 2 , the optical system which ties the objective lens 10 and the light-receiving machine 20 which detects the condensed fluorescence is called "the optical system for measurement."

[0131] The fluorescence from a fluorescent substance passes the objective lens 10, and is made to carry out image formation to an aperture 16 with a lens 15, and the acceptance surface of the light-receiving machine 20 is made to carry out a focus with the condenser 17 after that. Ahead of the acceptance surface of the light-receiving machine 20, the Ir cut off filter 18 and a band pass filter 19 are arranged, and it is made only for the fluorescence from a fluorescent substance to reach the light-receiving machine 20. The Ir cut off filter 18 cuts noise light, such as reflected light by the optical system in the middle of the light path on the wall surface of the measuring cell 1, the rear face of a mirror, etc. A band pass filter 19 passes only the light of a fluorescence wavelength efficiently.

[0132] It << optical-power-detector >> Ranks second, and "the optical power detector 20 which detects the fluorescence which condensed one by one and generates the discernment signal corresponding to the detected fluorescence" is explained. Weak optical power detectors, such as an avalanche photo-diode or a photomultiplier tube, can be used for the optical power detector 20. The optical power detector 20 detects the fluorescence corresponding to the class of base of the mononucleotide concerned in the order of the cut mononucleotide. And the detected fluorescence is changed into the discernment signal corresponding to it, and is transmitted to the below-mentioned analysis means. Specifically, it is changed into a photoelectron with the optical power detector 20.

[0133] "Analysis means 21-23 to read the base sequence of said nucleic acid in the discernment signal which said optical power detector generated" is explained to the << analysis means >> last. An analysis means processes the signal acquired from the optical power detector 20 by the signal analysis part 21, and displays the result on the monitoring screen of a computer 23. After the lightwave signal changed into the photoelectron with the optical power detector 20 processes waveform shaping etc. in the signal analysis part 21, it is led to a computer 23 as a photon pulse, calculation of the number of pulses is carried out, and, specifically, it is displayed on the screen of a computer. The signal-control part 22 can feed back the last information sent to a computer to the laser light source for carrier capture, and can cancel the trap of a carrier.

[0134] In order to photo the condition of having caught the carrier, to the base-sequence-determination equipment of the form of this operation shown in composition >> drawing 2 for observing the capture condition of << carrier, the light source 24 for irradiating the illumination light and the optical systems 25, 26, 15, and 10 for Lighting Sub-Division are installed in the watercourse of said measuring cell. In drawing 2, a light source 24 is a halogen lamp and the optical systems 25, 26, 15, and 10 for Lighting Sub-Division consist of a lens 25, a movable mirror 26, a lens 15, and an objective lens 10. After the illumination light from a light source 24 passes a lens 25, is crooked in the direction of a measuring cell by the movable mirror 26 and passes a lens 15, it is condensed by the test sample for chemical analysis with the objective lens 10.

[0135] In addition, in the equipment of this invention, this light source and the optical system for Lighting Sub-Division are not necessarily required. Therefore, when not using it, you may remove from the optical system for measurement by moving the movable mirror 26 if needed.

[0136] Moreover, the optical systems 10, 15, 27-29 for photography and the image pick-up means 30 for photoing the condition of having caught the carrier, under said illumination light are installed in the base-sequence-determination equipment of the form of this operation shown in drawing 2. In drawing 2, the optical systems 10, 15, 27-29 for photography consist of the objective lens 10, a lens 15, movable prism 27, a band pass filter 28, and a lens 29, and the image pick-up means 30 is a CCD camera. [the reflected light from the test sample for chemical analysis which has irradiated the illumination light] The objective lens 10 and a lens are crooked in the CCD camera 30 direction with the movable prism 27, after passing 15, only the light of a wavelength required of a band pass filter 28 is made to penetrate selectively, and it is sent to the image pick-up means (CCD camera) 30 through a lens 29. Thus, the optical system for photography makes the light of the wavelength efficiently received with CCD camera 30 penetrate selectively, and imaging is carried out on a television monitor.

[0137] In addition, in order for the optical system for photography and the optical system for Lighting Sub-Division to irradiate the caught carrier in the watercourse of a measuring cell in drawing 2 and to picturize, it is required to make it in agreement with the optical system for measurement with the movable prism 27. Moreover, in the equipment of this invention, this optical system for photography and an image pick-up means are not necessarily required. Therefore, you may remove from the optical system for measurement if needed by using it, only when catching a carrier, and moving the movable prism 27 at the time of others.

[0138] [Form of the 2nd operation] Next, the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 2nd of this invention is explained with reference to drawing 10.

[0139] The 2nd fundamental composition of the form of operation is the same as the form of the 1st operation. In the form of operation of the 2nd of drawing 10, the same sign is attached about the same portion (codes 1-30) as the form of the 1st operation shown in drawing 2. The test sample for chemical analysis which carried out the discernment sign of the base of nucleic acid using two kinds of fluorescent substances is used for the equipment of the form of this operation.

[0140] Therefore, with the form of this operation, two kinds of lasers with which radiation wavelengths differ, for example, argon ion laser, (wavelength 514.5nm), and a solid blue laser (wavelength of 473nm) are used as a laser light source for excitation. Therefore, in addition to the laser light source 11 for excitation, the second laser light source 31 for excitation is installed in the equipment of the form of this operation in drawing 10.

[0141] The optical beam from the second laser light source 31 for excitation is also made into a collimated beam with a collimate lens 32, and is enlarged in a beam diameter by the beam expander 33. [as well as the optical beam from the laser light source 11 for excitation] Then, a light path is bent with the die clo IKKU half mirrors 35 and 14 of 34 or 2 mirrors, and it is led to the objective lens 10. The optical beam from these two laser light sources 11 and 31 for excitation is summarized to one light path with the die clo IKKU half mirror 35, and is led to the objective lens 10.

[0142] Thus, two kinds of fluorescent substances can be excited by using two kinds of lasers with which wavelengths differ. As two kinds of fluorescent substances, rhodamine Green (RG) and tetramethyl rhodamine 5-isothiocyanate (TMR) can be used, for example. Rhodamine Green is excited by a solid blue laser (473nm), fluorescence with a wavelength of 550nm is emitted, and on the other hand, tetramethyl rhodamine 5-isothiocyanate is excited by argon laser (514.5nm), and emits fluorescence with a wavelength of 570nm. It becomes possible to distinguish and detect two kinds of bases by making the fluorescence of a different wavelength using two kinds of fluorescent substances emit.

[0143] With the form of this operation, in order to detect the fluorescence of an emitted different wavelength, it is

necessary to also make the optical system for measurement into two lines. That is, the fluorescence from two kinds of fluorescent substances is adjusted so that it may double with the luminous wavelength of each fluorescent substance and transmission hardness may become the maximum with the dielectric half mirror 36, and a light path is divided into two. As for the light divided into two, one of these passes along a band pass filter 19, and is received with the light-receiving machine 20. The lightwave signal changed into the photoelectron with the light-receiving machine is processed in the signal analysis part 21, it is sent to a computer 23 as a photon pulse, and calculation of the number of pulses is carried out. Similarly, another light also passes along a band pass filter 37, and is received with the light-receiving machine 38. The signal from the light-receiving machine 20 is processed in the signal analysis part 39, and is sent to a computer 23. In addition, the signal-control part 22 can feed back the received information to the laser light source for carrier capture, and can cancel the trap of a carrier.

[0144] The composition of such two optical systems for measurement is fundamentally [as one optical system for measurement in the form of the 1st operation] the same. The field which measures the strength of the light with two light-receiving machines is the same field. Thus, about two light paths, fluorescence is independently detectable, respectively.

[0145] The equipment of the form of the 2nd operation has the following advantages. That is, the location of two kinds of fluorescence can be simultaneously read by one measurement, and the base sequence corresponding to this can be read. Therefore, measurement precision can be raised while reducing the number of times of measurement compared with the equipment of the form of the 1st operation.

[0146] In addition, the base-sequence-determination equipment of this invention can also determine the base sequence of the nucleic acid which carried out the discernment sign of the base using three kinds of fluorescent substances which install and distinguish three laser light sources for excitation, and may be detected. The base-sequence-determination equipment which installed the laser light source for excitation exceeding three more is also possible, and such equipment is also included by the range of this invention.

[0147] [Form of the 3rd operation] Next, the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 3rd of this invention is explained with reference to drawing 11 .

[0148] The 3rd fundamental composition of the form of operation is the same as the form of the 1st operation. The same sign is attached about the same portion (codes 1-30) as the form of the 1st operation which is shown in drawing 11 and which is shown in drawing 2 in the form of the 3rd operation. The test sample for chemical analysis which carried out the discernment sign of the base of nucleic acid using one kind of fluorescent substance is used for the equipment of the form of this operation like the form of the 1st operation.

[0149] the whole surface as shown in drawing 12 as a measuring cell equipped with the watercourse with the form of this operation -- transparent measuring cell 1' is used. Drawing 12 is drawing corresponding to drawing 3 (c), and is the sectional view cut along the watercourse.

[0150] The structure of measuring cell 1' is fundamentally [as the measuring cell 1 shown in drawing 3] the same. The measuring cells 1 differ to only the field which laser light penetrates being transparent in that measuring cell 1' used here is a cell with the transparent whole surface. Measuring cell 1' may consist of a glass plate, Pyrex (registered trademark) or an acrylic, and a transparent plastic sheet like vinyl chloride resin, for example.

[0151] The optical system for photography for observing the condition that carrier particles were caught can be made to separate from the optical system for measurement by using such measuring cell 1'. That is, in drawing 11 , the optical systems 43, 28-29 for photography are separated with the optical system from the objective lens 10 which is an optical system for measurement to the light-receiving machine 20.

[0152] In the form of this operation, only the illumination light by a halogen lamp 24 and the light of a wavelength required of a band pass filter 28 after expanding to the objective lens 43 through the optical beam by the laser 3 for carrier capture are made to penetrate selectively, and it picturizes with the image pick-up means (CCD camera) 30 through a lens 29.

[0153] Moreover, the base-sequence-determination equipment of this invention may be equipped with the shutter opened and closed corresponding to the action of each optical system as it is illustrated by drawing 11 . The first optical system which specifically leads the laser for carrier capture to a measuring cell from a light source 3 in drawing 11 , Shutters 40, 41, and 42 are installed in each of the second optical system which leads the laser for excitation to a measuring cell from a light source 11, and the optical system for measurement from the objective lens 10 to the light-receiving machine 20 in order.

[0154] Thus, since transmission will be observed while the disturbance to the measuring beam of the optical system for observation is removable by making the optical system for photography separate from the optical system

for measurement, a view becomes bright and the situation of conveyance of carrier particles and the situation of particle capture can be detected clearly.

[0155] [Form of the 4th operation] Next, the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 4th of this invention is explained with reference to drawing 13 .

[0156] The 4th fundamental composition of the form of operation is the same as the form of the 1st operation. The same sign is attached about the same portion (codes 1-30) as the form of the 1st operation which is shown in drawing 13 and which is shown in drawing 2 in the form of the 4th operation. The test sample for chemical analysis which carried out the discernment sign of the base of nucleic acid using one kind of fluorescent substance is used for the equipment of the form of this operation like the form of the 1st operation.

[0157] the whole surface as shown in drawing 12 as a measuring cell equipped with the watercourse like the equipment concerning the form of the 3rd operation with the form of this operation -- transparent measuring cell 1' is used.

[0158] The optical system for photography for observing the condition that carrier particles were caught can be made to separate from the optical system for measurement by using such measuring cell 1'. That is, in drawing 13 , the optical systems 43, 28-29 for photography are separated with the optical system from the objective lens 10 which is an optical system for measurement to the light-receiving machine 20.

[0159] Thus, since transmission will be observed while the disturbance to the measuring beam of the optical system for observation is removable by making the optical system for photography separate from the optical system for measurement, a view becomes bright and the situation of conveyance of carrier particles and the situation of particle capture can be detected clearly.

[0160] furthermore -- the form of this operation -- the whole surface -- it becomes possible by using transparent measuring cell 1' to make the first optical system which leads the laser for carrier capture to a measuring cell separate from the second optical system and optical system for measurement which lead the laser for excitation to a measuring cell. That is, in drawing 13 , the first optical system 4-9, and 43 is separated from the second optical systems 11-14, and 10 and optical systems 10, 14-20 for measurement. In drawing 13 , the laser for carrier capture enters from the upper surface of a measuring cell, and condenses in a watercourse, and the laser for excitation enters from the underside of a measuring cell, and condenses in a watercourse.

[0161] Thus, it becomes easy by sharing the same optical system and not making the laser for carrier capture (infrared light), and the laser for excitation (visible light) condense in a watercourse to double the focal location of each laser light. Generally, in infrared light and a visible light, in order to double a focal location with the same location through the same optical system, an amendment optical system is needed. However, it becomes possible like drawing 13 to double a focal location uniquely, respectively by letting a separate optical system pass for the laser for carrier capture, and the laser for excitation.

[0162] In addition, please also refer to description of the following detailed base-sequence-determination methods about the action of the base-sequence-determination equipment concerning the form of implementation of all above.

[0163] The <base-sequence-determination method>, next the base-sequence-determination method of this invention are explained. In addition, the base-sequence-determination method of this invention can be performed using above-mentioned equipment. Please also refer to the composition of above-mentioned equipment suitably.

[0164] The base-sequence-determination method of this invention the nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base, and the class of fluorescent substance as a test sample for chemical analysis using the carrier made to adhere as a measuring cell The process which conveys the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is the base-sequence-determination method using the cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse, and is one test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, 2) The process which catches in a watercourse the carrier to which said nucleic acid was made to adhere by a laser trap, 3) The process which pours the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes nucleic acid in said watercourse sequentially from an end, 4) the process which excites in order the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid, and 5 -- it is the method of providing the process which detects the fluorescence which the fluorescent substance excited by said process emits one by one, and reads the base sequence corresponding to the detected fluorescence.

[0165] In a desirable mode, [the base-sequence-determination method of this invention] The nucleic acid which matched and carried out the discernment sign of the class of base, and the class of fluorescent substance as a test

sample for chemical analysis using the carrier made to adhere as a measuring cell. The process which conveys the suspension of a carrier to which said nucleic acid which is the base-sequence-determination method using the cell which equipped the core with the watercourse and was equipped with the transparent field for making an optical beam penetrate into said watercourse, and is one test sample for chemical analysis was made to adhere to the watercourse of said measuring cell, 2-1) The process which catches in a watercourse the carrier to which said nucleic acid was made to adhere by a laser trap, 2-2) the process which checks that the nucleic acid molecule by which the discernment sign was carried out with the fluorescent substance has adhered to the carrier caught by said process by irradiating excitation light, and 2-3 -- in said watercourse The process which locates the radiation location of the laser for catching said carrier upstream of the radiation location of said excitation light, 3) The process which pours the enzyme liquid which cuts the mononucleotide which constitutes nucleic acid in said watercourse sequentially from an end, 4) Detect the fluorescence to which the fluorescent substance excited by the process excited in order and the 5 aforementioned processes emits the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base of the mononucleotide cut with said enzyme liquid one by one. It is the method of providing the process which reads the base sequence corresponding to the detected fluorescence.

[0166] About the test sample for chemical analysis and measuring cell which are used by the base-sequence-determination method of this invention, it is as above-mentioned description. Each process of 1-5 is explained in order hereafter. Please also refer to the flowchart figure shown in drawing 14 about the whole base-sequence-determination method flowing.

[0167] 1) Convey to a measuring cell according to solution carrying-in / taking-out mechanism in which the conveyance test sample for chemical analysis (carrier suspension to which the nucleic acid which carried out the discernment sign of the base with the fluorescent substance was made to adhere) of a test sample for chemical analysis is shown in drawing 5.

[0168] 2-1) Turn on the laser for capture carrier capture of a carrier, and catch one carrier by a laser trap. When one carrier is caught, it is good to flush the carrier of others which exist all over a watercourse and which were not caught with buffer solution. Here, the condition that one carrier was caught can be checked by an image pick-up means (CCD camera).

[0169] 2-2) It can also check adhering to the nucleic acid molecule by which the discernment sign was carried out to the caught carrier with the fluorescent substance as follows. Where a carrier is caught by a laser trap, the laser for excitation is turned on. At this time, the optical beam of the laser for excitation irradiates the carrier caught through the same light path as the laser for carrier capture. The fluorescent substance which is carrying out the sign of the nucleic acid which the carrier is supporting by this is excited.

[0170] Subsequently, the existence of the fluorescence emitted from a fluorescent substance is measured. The signal of the fluorescence emitted is changed into an electric signal (photon pulse), and is detected. An example as a result of fluorometry is shown in drawing 15. A certain threshold is decided beforehand, and only when many numbers of photon pulses are measured rather than this, it is judged that fluorescence was detected. This threshold may be suitably set up in consideration of the background noise of equipment etc.

[0171] When the number of photon pulses is lower than a threshold and fluorescence is not detected (in the case [Flowchart] of "NO"), it is judged that the nucleic acid molecule has not adhered to a carrier. A commander is taken out with a signal-control part at this time, radiation of the laser for carrier capture is stopped, and the trap of a carrier is canceled. The suspension of a carrier is again poured to a measuring cell, and the same action is repeated until fluorescence is detected in fluorometry.

[0172] When the number of photon pulses is higher than a threshold and fluorescence is detected (in the case [Flowchart] of "YES"), it is judged that the nucleic acid molecule has adhered to the carrier.

[0173] 2-3) If it is checked that the nucleic acid molecule has adhered to the caught carrier, the radiation location of the laser for carrier capture and the laser for excitation which is irradiating the carrier through the same light path will be changed into a predetermined condition (predetermined condition shown in drawing 9) required for the analysis of a base sequence. That is, when conveying in a watercourse the dialytic ferment liquid which cuts one nucleobase at a time, the carrier is caught in the upstream and the condition that the laser for excitation is irradiated in the lower stream is built. A predetermined condition can be built by specifically moving the laser beam for carrier capture which suited on the same light path as the laser beam for excitation to an optical axis and a perpendicular direction (the length direction of a watercourse). Or you may make the predetermined condition shown in drawing 9 by shifting the light path of the laser beam for excitation from the light path of the laser beam for carrier capture.

[0174] [here / the distance to which the laser for carrier capture and/or the laser beam for excitation are moved] It is made not to be limited especially if located in the location which both lasers left in the objective lens view, but to move until it is located in the location which both lasers left most within the objective lens view preferably (about 25 micrometers).

[0175] 3) After both laser beams are set as the predetermined condition for analyzing the introductory base sequence of a dialytic ferment, pour the buffer solution which contains a dialytic ferment according to solution carrying-in / taking-out mechanism to the watercourse of a measuring cell. The mononucleotide of the nucleic acid adhering to a carrier is cut sequentially from an end by introduction of a dialytic ferment.

[0176] As buffer solution containing a dialytic ferment, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, and 2.5mM DTT can be used. Exonuclease, T7 polymerase, etc. which have the activity of 10 - 200nM can be used for a dialytic ferment. A decomposition reaction is performed at a room temperature in this buffer solution. Composition of buffer solution, temperature, etc. are not limited to the above-mentioned thing.

[0177] The rate of flow will not be limited, if it is the speed (lower limit) which the cut mononucleotide keeps the cutting order and can be flowed through a watercourse as above-mentioned and is the speed (maximum) which does not escape from the condition that the laser trap of the carrier was carried out. For example, it can be made about 1 mm/s.

[0178] In addition, it is necessary to perform operation of conveying solution in a watercourse so that pulsating flow may not arise after a carrier is caught in a watercourse. This is to keep the carrier caught from being washed away by pulsating flow, and is for the cut base keeping the order and making it have the inside of a watercourse conveyed.

[0179] 4) The base of the mononucleotide cut with fluorescence illuminant solution enzyme flows into the order cut by the radiation location (namely, measurement field) of the laser for excitation in a watercourse under control of the above-mentioned rate of flow. The fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of the base is excited one by one by this, and the fluorescence emitted at this time is led to the optical system for measurement through an objective lens one by one.

[0180] 5) With the fluorescent substance which is carrying out the discernment sign of each base of the reading nucleic acid of a base sequence, a base sequence is deciphered one by one.

[0181] The example which matched and carried out the discernment sign of the class of base of nucleic acid and the class of fluorescent substance is given hereafter.

[0182] For example, the reading result of a base sequence is shown about the test sample for chemical analysis which used one kind of fluorescent substance for drawing 16 , and carried out the discernment sign of the one kind of a DNA base to it. This test sample for chemical analysis can read arrangement using the equipment of the form of operation of the 1st of this invention.

[0183] It is shown among drawing that "O" has a sign by a fluorescent substance in this base and that "x" does not have a sign by a fluorescent substance in this base. Let what carried out fluorescent labeling of a sample 1-2 and all the thymines for what carried out fluorescent labeling of a sample 1-1 and all the guanine for what carried out fluorescent labeling of all the adenine among four kinds of bases of Sample DNA be a sample 1-3.

[0184] Thus, when the sign only of the single base is carried out, in order to read all the base sequences, at least 3 times of measurement counts are needed, but the base sequence of DNA can be read as the reading result shows.

[0185] Moreover, the reading result of a base sequence is shown about the test sample for chemical analysis which used two kinds of fluorescent substances for drawing 17 , and carried out the discernment sign of two kinds of bases to it. This test sample for chemical analysis can read arrangement using the equipment of the form of operation of the 2nd of this invention.

[0186] It is shown among drawing that "O" has a sign by the fluorescent substance A (for example, TMR) in this base, that "-" has a sign by the fluorescent substance B (for example, RG) in this base, and that "x" does not have a sign by a fluorescent substance in this base. Let what carried out the discernment sign of a sample 2-1, a thymine, and the cytosine for what carried out the discernment sign of adenine and the guanine with two kinds of fluorescent substances A and B among four kinds of bases of Sample DNA, respectively with two kinds of fluorescent substances A and B, respectively be a sample 2-2. The reading result is collectively shown in drawing 18 .

[0187] Thus, if two kinds of fluorescent substances are used, the location of two kinds of bases can be simultaneously detected by one measurement, and the measurement count for reading all the base sequences can be made into at least 2 times. It becomes possible to perform sequencing for a short time as compared with the case (example shown in drawing 16) where one kind of fluorescent substance is used.

[0188] Moreover, two kinds of fluorescent substances are used for drawing 19 , and the reading result of a base sequence is shown about the test sample for chemical analysis which, in addition to this, carried out the discernment sign of three kinds of bases to one kind of base. This test sample for chemical analysis can read arrangement using the equipment of the form of operation of the 2nd of this invention.

[0189] It is shown among drawing that "O" has a sign by the fluorescent substance A (for example, TMR) in this base and that "-" has a sign by the fluorescent substance B (for example, RG) in this base. The sign of the adenine is carried out with the fluorescent substance A among four kinds of bases of Sample DNA. Carry out what carried out the sign of the other bases (G, T, C) with the fluorescent substance B by a sample 3-1, and the sign of the guanine is carried out with the fluorescent substance A. Let what carried out what carried out the sign of the other bases (A, T, C) with the fluorescent substance B by the sample 3-2, carried out the sign of the thymine with the fluorescent substance A, and carried out the sign of the other bases (A, G, C) with the fluorescent substance B be a sample 3-3.

[0190] Thus, since fluorescence will come to be observed about four kinds of all bases if the discernment sign of four kinds of all bases is carried out using two kinds of fluorescent substances, measuring accuracy can be raised. It becomes unnecessary that is, for the length of the time when fluorescence was not detected to determine the number of bases with which fluorescence was not observed like the example shown in drawing 16 and drawing 17

[0191] In addition, as for the method of this invention, it is desirable to change a DNA molecule, to acquire two or more times of sequencing data to one test sample for chemical analysis, and to raise the reliability of data. In addition, the pattern which carries out the discernment sign of the base of nucleic acid is not limited to drawing 16 , drawing 17 , and the example shown in drawing 19 , but can be set up suitably.

[0192]

[Effect of the Invention] As explained above, this invention offers new base-sequence-determination equipment and the base-sequence-determination method. According to this invention, skill is not needed but, moreover, the base sequence of nucleic acid can be read easily in a short time. Moreover, this invention has the advantage that there is no restriction in the length of the nucleic acid used as a sample theoretically.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing showing the test sample for chemical analysis used for the base sequence determination of this invention.

[Drawing 2] Drawing showing the composition of the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 1st of this invention.

[Drawing 3] Drawing showing the composition of a measuring cell.

[Drawing 4] Drawing showing another example of a measuring cell.

[Drawing 5] Drawing showing the composition of solution carrying-in / taking-out mechanism.

[Drawing 6] Drawing showing the example of the autonomous working of solution carrying-in / taking-out mechanism.

[Drawing 7] Drawing showing the example of the autonomous working of solution carrying-in / taking-out mechanism.

[Drawing 8] Drawing showing signs that one carrier is caught in the watercourse of a measuring cell.

[Drawing 9] Drawing showing the situation in the watercourse of the measuring cell at the time of base sequence analysis.

[Drawing 10] Drawing showing the composition of the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 2nd of this invention.

[Drawing 11] Drawing showing the composition of the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 3rd of this invention.

[Drawing 12] the whole surface -- drawing showing the composition of a transparent measuring cell.

[Drawing 13] Drawing showing the composition of the base-sequence-determination equipment concerning the form of operation of the 4th of this invention.

[Drawing 14] The flowchart figure showing the flow of the base-sequence-determination method of this invention.

[Drawing 15] Drawing showing an example of the result of having measured the existence of the fluorescence of a test sample for chemical analysis.

[Drawing 16] Drawing showing an example of a result which analyzed the base sequence of DNA.

[Drawing 17] Drawing showing an example of the result which the base sequence of DNA analyzed.

[Drawing 18] Drawing showing the measurement result of drawing 17 .

[Drawing 19] Drawing showing an example of a result which analyzed the base sequence of DNA.

[Explanations of letters or numerals]

1 1' -- A measuring cell, 1a, 1a -- A body portion, 1b -- A surface portion, 1c, 1c' -- A watercourse, 1d, 1d -- A contact button, 1e -- The electrode holder of the measuring cell equipped with the watercourse, 2 -- Solution carrying-in / taking-out mechanism, 2a -- The tank for carrying in, 2b -- The inner tube for carrying in, 2c -- The tank for taking out, 2d -- The inner tube for taking out, 3 -- The laser light source for carrier capture, 4 [-- Mirror,] -- A collimate lens, 5 -- A beam expander, 6 -- A lens, 7 8 -- A lens, 9 -- A die clo IKKU half mirror, 10 -- Objective lens, 11 -- The laser light source for excitation, 12 -- A collimate lens, 13 -- Beam expander, 14 -- A die clo IKKU half mirror, 15 -- A lens, 16 -- Aperture, 17 -- A condenser, 18 -- Ir cut off filter, 19 -- Band pass filter, 20 [-- Computer,] -- A light-receiving machine, 21 -- A signal analysis part, 22 -- A signal-control part, 23 24 [-- Movable prism,] -- A halogen lamp, 25 -- A lens, 26 -- A movable mirror, 27 28 -- a band pass filter and 29 -- a lens and 30 -- a CCD camera and 31 -- the -- The laser light source for excitation of two, and 32 -- a collimate lens and 33 -- a beam expander and 34 -- a mirror and 35 -- a die clo IKKU half mirror -- 36 -- A die clo IKKU half mirror, 37 -- Band pass filter, 38 [-- Shutter (2),] -- A light-receiving machine, 39 -- A signal analysis part, 40 -- A shutter (1), 41 42 -- A shutter (3), 43 -- An objective lens, 44 -- Dialytic ferment introduction syringe, 45 [-- T type joint, 49 / -- T type joint, 50 / -- A contact button, 51 / -- A contact button, 52 / -- A negative pressure pump, 53 / -- A waste fluid tank, 54 / -- T type joint, 55 / -- T type joint] -- A sample introduction syringe, 46 -- A buffer solution tank, 47 -- A buffer solution tank, 48
